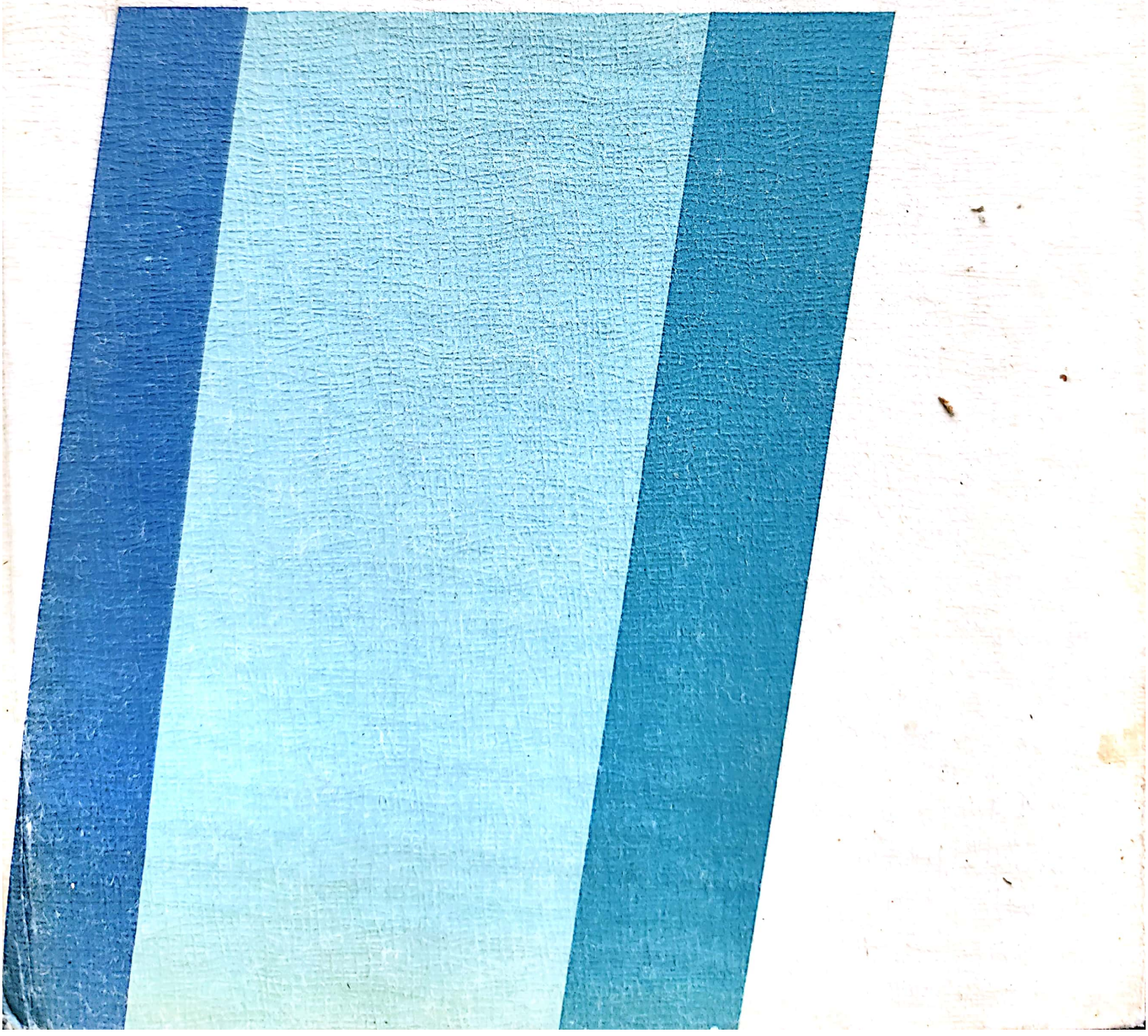
Ștefan Antohi - Lucian Gavrilă

PROGRESE ÎN GENETICA MOLECULARĂ



Scanned with OKEN Scanner

ȘTEFAN ANTOHI — LUCIAN GAVRILĂ

PROGRESE ÎN GENETICA MOLECULARĂ

EDITURA ȘTIINȚIFICĂ ȘI ENCICLOPEDICĂ
București, 1981

Otilia Ivan

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

pag.

Prefață 9

I. **Genetica moleculară ; definiție, etapele de fundamentare** 11

II. **Macromolecule informaționale** 20
1. Trăsăturile comune ale macromoleculelor informaționale 21
2. Interacțiunile dintre macromoleculele informaționale constituie și baza structurală a organitelor, celulelor și țesuturilor 27
3. Interacțiunea transferului de informație în expresia genică perpetuă a macromoleculelor informaționale 27

III. **Structura ADN, compoziție chimică și arhitectură moleculară. Biosinteza replicativă a ADN** 29
1. Compoziția chimică a ADN 29
2. Structura primară a ADN. 31
3. Structura secundară a ADN sau structura bicatenară 32
4. Structura terțiară a ADN 37
5. ADN monocatenar nativ. 39
6. Unele proprietăți fizice ale ADN importante pentru funcțiile sale biologice 40
7. Analiza secvenței de nucleotide din ADN 46
8. Sinteza chimică a ADN 50
9. Sinteza replicativă a ADN. Principiile reacției 50
10. Sinteza *in vitro* a ADN 52
11. Aparatul enzimatic al replicării. ADN-polimerazele 53
12. Alte enzime participante în replicare. 56
13. Concluzii 58
14. Desfășurarea evenimentelor biochimice și biofizice la nivelul sitului activ al polimerazei (modelul Kornberg de replicare a ADN). 59
15. Replicarea discontinuă (segmentară) a ADN (modelul Okazaki) . . . 63
16. Excepții de la replicarea semiconservativă obișnuită 69
17. Replicarea la bacterii și bacteriofagi. 69
18. Replicarea ADN la eucariote. 80
19. Semnificația secvenței de baze, a structurii bicatenare și a replicării semiconservative a ADN 85

IV. **Structura ARN și transcrierea genetică** 87
1. Structura ARN 87
2. ARN-polimeraza bacteriană 90
3. Desfășurarea procesului de transcriere 91
4. ARN-polimerazele induse de infecția fagică 98
5. ARN-polimerazele eucariote 99

Scanned with OKEN Scanner

6. ARN celular 103
7. ARN nuclear eterogen (ARNhn sau ARNhet) 127
8. ARN cromozomal (ARNc) 129

V. **ARN viral şi reverstranscrierea** 130
1. ARN viral şi replicarea sa 130
2. Reverstranscrierea 134

VI. **Bazele moleculare ale organizării genetice** 140
1. Organizarea genomului viral 140
2. Organizarea genomului bacterian 145
3. Organizarea genomică mezocariotă 149
4. Organizarea genomului eucariot 151

VII. **Organizarea şi funcţionarea genomului extranuclear** 181
1. Ereditate extranucleară: substrat fizic şi criterii 181
2. Genomul cloroplastic 183
3. Genomul mitocondrial 191

VIII. **Sinteza lanţurilor polipeptidice. Etapa de traducere a informaţiei în expresia genică** 213
1. Activarea aminoacizilor şi formarea complexelor amino-acil-ARNt (AA-ARNt); AA-ARNt-sintetazele 213
2. Iniţierea sintezei lanţurilor polipeptidice 216
3. Elongaţia în sinteza lanţurilor polipeptidice sau reacţia de polimerizare a aminoacizilor în polipeptide macromoleculare 225
4. Terminarea sintezei lanţului polipeptidic 232
5. Caracterele ansamblului de reacţii din traducerea mesajului genetic, raporturile numerice dintre ARNm şi lanţurile polipeptidice; erorile inerente traducerii 235

IX. **Formarea proteinelor funcţionale şi expresia genică. Prelucrarea polipeptidelor precursoare** 242
1. Prelucrarea lanţurilor polipeptidice şi constituirea proteinelor mature funcţionale 242
2. Degradarea continuă a proteinelor şi expresia genică 253
3. Caracterul multigenic al expresiei genice şi finisarea caracterelor complexe ca etapă distinctă a transferului informaţional 255

X. **Controlul cantitativ şi programarea expresiei genice în adaptare şi diferenţiere** 258
1. Nivelele de control şi gradul lor de generalizare 259
2. Mecanismul alosteric şi interacţiunile dintre macromolecule 261
3. Modularea cantitativă prin controlul enzimelor reglatoare 272
4. Controlul cantitativ al expresiei genice prin reglarea sintezei proteinelor la nivelul traducerii 278
5. Reglarea sintezei de proteine prin inducţie şi represie. Progrese în cunoaşterea sistemului operon 279

Scanned with OKEN Scanner

6. Controlul expresiei genice ca bază moleculară a adaptării vieţuitoarelor la mediu 294
7. Diferenţierea ca mecanism de programare a expresiei genice la organismele pluricelulare 297

XI. **Mutaţiile şi recombinările, mecanisme moleculare întrepătrunse ale variabilităţii** 312
1. Date clasice care indică întrepătrunderea fenomenelor de mutaţie şi recombinare 312
2. Mecanismele moleculare ale mutaţiei 313
3. Mecanismele moleculare ale recombinării 325
4. Etapele recombinării în cadrul unui *crossing-over* la nivelul ADN. Modele de recombinare şi conversia genică 332
5. Reglarea cantitativă a recombinării şi diversitatea acesteia 338
6. Conexiunile şi suprapunerile recombinării cu mutaţia, replicarea, degradarea şi transcrierea ADN ca metabolit macromolecular 339
7. O parte din mutaţiile punctiforme şi marile schimbări structurale nu pot fi explicate decît prin prejudicii mutaţionale şi recombinări luate împreună 341
8. Progrese în cunoaşterea expresiei genice a mutaţiilor. 344
9. Mutaţiile şi recombinările ca mecanism principal al evoluţiei şi polimorfismului. 350
10. Mutaţii germinative şi mutaţii somatice 353
11. Patologia moleculară şi mutageneza ecologică 354
12. Mutaţiile ca producătoare de alelism şi implicit furnizoare de markeri genetici 364

XII. **Aspecte moleculare ale cartografiei (cartării) genetice** 367
1. Generalităţi asupra principiilor morganiene de cartare genetică şi relaţiile lor cu studiile moleculare 367
2. Sintenia la genoamele pluricromozomale şi cartografia cromozomală 372
3. Aspectele moleculare ale cartării genetice la virusuri şi bacterii . . . 384

XIII. **Plasmide bacteriene. ŞERBAN IORDĂNESCU** 401
1. Menţinerea plasmidelor în celula gazdă 401
2. Incompatibilitatea plasmidică 414
3. Recombinarea plasmidică 418
4. Interrelaţii plasmid-celulă gazdă 422
5. Semnificaţia biologică a plasmidelor 424

XIV. **Manipularea genelor sau clonarea genică** 425
1. Obţinerea de extremităţi adezive prin endonucleaze restrictive şi terminal-dezoxinucleotidil-transferaza (TdT-aza) 426
2. Moleculele vectoare sau purtătoare pentru clonarea de gene 431
3. Formarea exocelulară a moleculelor recombinant-prelucrare necesară manipulării de gene 432

Scanned with OKEN Scanner

4. Etapele manipulării genice şi celulele acceptoare pentru captarea şi amplificarea clonală 433
5. Multiplicarea genică asigurată de vectori 437
6. Expresia genică a moleculelor clonate în celulele de *E. coli* 438
7. Posibilităţi de clonare şi în alte celule decît *E. coli* şi ale integrării de ADN străin în celule eucariote 439
8. Riscurile, avantajele şi perspectivele manipulării genelor 440

Bibliografie 445

Scanned with OKEN Scanner

REFAȚĂ

Dinamismul ridicat al achizițiilor moleculare recente din domeniile geneticii face improbabilă tratarea exhaustivă a progreselor în genetica moleculară, mai ales într-un număr limitat de pagini și la o dată aprioric fixată. Din aceste motive, lucrarea de față își propune numai prezentarea progreselor realizate în cunoașterea mecanismelor moleculare bazale. Deoarece cartea se adresează unui public cititor de mare diversitate, autorii au considerat necesară integrarea progreselor recente în cunoștințele clasice, eliminînd totodată unele erori de interpretare sau de înțelegere, inerente unui domeniu nestandardizat, aflat în stare „născîndă". Materialul prezentat abordează cu prioritate problemele de concepție din genetica moleculară și mult mai puțin aspectele de tehnică. Această orientare se bazează pe constatarea că tehnicile folosite în genetica moleculară sînt nespecifice, ele fiind preluate din biochimie, imunologie, bacteriologie etc. și numai conceperea sistemelor de model experimental și interpretarea sînt specific genetice. Astfel, cunoștințele de genetică moleculară devin un instrument aplicativ de concepție și interpretare. Pentru ilustrare, să luăm ca exemplu electroforeza (din multe alte exemple posibile): deși este o metodă fizico-chimică, fiind utilizată de un cunoscător al geneticii, ea devine o tehnică de genetică moleculară cu mare eficiență în cercetare.

Planul general al lucrării și capitolele I, II, VIII, IX, X, XI XII și XIV sînt realizate de dr. Ștefan Antohi. Capitolele III, IV, V, VI și VII sînt scrise de dr. Lucian Gavrilă. Pentru descrierea plasmidelor bacteriene (cap. XIII) l-am solicitat pe dr. Șerban Iordănescu, expert recunoscut în plasmidologie, domeniu cu implicații profunde în genetica moleculară.

Scanned with OKEN Scanner

Adresăm cele mai sincere mulţumiri prof. dr. doc. Nicolae Cajal, membru corespondent al Academiei R.S.R., director al Institutului de virusologie din Bucureşti, pentru preţioasele indicaţii date în calitate de referent ştiinţific.

În acelaşi context subliniem recunoştinţa noastră faţă de dr. Mircea Mâciu, director al Editurii Ştiinţifice şi Enciclopedice, pentru larga înţelegere în acordarea condiţiilor solicitate pentru completări calitative aduse materialului prezentat iniţial.

AUTORII

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul I

GENETICA MOLECULARĂ : DEFINIȚIE, ETAPELE DE FUNDAMENTARE

Prin genetică moleculară se înțelege totalitatea studiilor și cunoștințelor referitoare la proprietățile structurale, de interacțiune și funcționale ale moleculelor care alcătuiesc substratul material al eredității, variabilității și determinării caracterelor. Termenul nu are o delimitare strictă față de domeniile geneticii generale, biochimiei și biologiei generale, iar cunoștințele pe care le vizează sînt definitorii pentru genetica modernă. Necesitatea stringentă de aprofundare a cunoașterii la nivel molecular, cît și aspectul facultativ al cerinței de delimitare au generat denumiri care semnifică particularități de specializare, cum sînt : citogenetica moleculară, genetica moleculară umană, genetica moleculară bacteriană.

Deși incomplet în fața complexității de organizare a materiei vii, termenul de genetică moleculară pare mai potrivit a semnifica nivelul complex al structurii macromoleculare, interacțiunile de ansamblu și de specificare informațională dintre acizii nucleici și proteine, distribuirea legăturilor de slabă energie, potrivirile sterice. Multitudinea de interacțiuni desfășurate în mulțimile moleculare ale materiei vii are ca rezultat organizări supramoleculare cu proprietăți structurale și funcționale care depășesc relațiile de însumare aritmetică și de reacții chimice exprimate ecuațional. De regulă se impune afirmația aparent paradoxală a topologiei că „întregul nu este egal cu suma părților".

Interrelațiile de la nivel molecular generează funcțiile de ereditate, variabilitate și de determinare a caracterelor, ansamblu de funcții care asigură partea intrinsecă a existenței, eterogenității și continuității materiei vii, în condițiile perpetuu variabile ale mediului ca parte extrinsecă de interacțiune. Ajungînd astfel în contextul principial al biologiei generale, se poate afirma că genetica moleculară este o ramură a biologiei moleculare, specializată în cunoașterea substratului material și funcțional al eredității, variabilității și determinării caracterelor care alcătuiesc și definesc viețuitoarele.

Pentru abordarea progreselor în cunoașterea mecanismelor moleculare ale geneticii, este necesară prezentarea succintă a conexiu-

Scanned with OKEN Scanner

nilor dintre principiile premoleculare (de exemplu, regulile mendeliene), datele geneticii moleculare intrate în patrimoniul clasic și datele recente. Aprioric preocupărilor moleculare, ereditatea, variabilitatea și exprimarea caracterelor au fost atribuite în bloc genei ca unitate mendeliană de funcție, aserțiune progresiv consolidată ca unul dintre principiile fundamentale ale geneticii. Un alt principiu premolecular de bază constă în faptul că modul de comportare a caracterelor fenotipice reflectă întocmai modul de comportare a genelor corespunzătoare, motiv pentru care proprietățile genelor pot fi studiate indirect prin analiza caracterelor fenotipice care devin astfel markeri. Un alt principiu premolecular important, în acest caz de natură structurală, constă în faptul că genele sînt cuprinse în cromozomi, unde sînt legate secvențial și alcătuiesc grupe ligaturale (sau lincate). Aceste principii au permis analize statistice ale distribuțiilor familiale și populaționale ale caracterelor marker. Aplicarea probabilităților mendeliene în studiile familiale, aplicarea distribuției binomice potrivit legii Hardy-Weinberg în studiile genetice populaționale, analiza statistică a procentelor de recombinanți ai împerecherilor experimentale de organisme purtătoare de caractere marker au furnizat cartografieri genetice de mare precizie (cap. XII), valorile frecvențelor de apariție a evenimentelor mutaționale și de recombinare, dinamica mixiei genice populaționale. Acestea au condus la preconizarea profilaxiei bolilor genetice, descoperirea anomaliilor cromozomale, recombinarea și selecția științifică a soiurilor de plante și raselor de animale de importanță economică. Marea majoritate a acestor descoperiri au rămas în genetică însoțite de necunoscute mereu prezente privind natura genei, structura genei, relațiile moleculare din mutație, recombinare și expresia fenotipică a genei. Deși observații preliminare anticipau implicațiile genelor în metabolismul primar al sintezei proteinelor (Garrod, 1902, 1909, Beadle și Tatum, 1941), apariția geneticii moleculare s-a bazat pe două lucruri revelatoare care au deschis epoca modernă a întregii biologii. În primul rînd, descoperirea transformării genetice la bacterii cu ajutorul ADN a permis în 1944 lui Avery și colegilor săi MacLeod și McCarty să dezvăluie natura genei. Gena este formată dintr-un segment de ADN, constituent omniprezent al materiei vii și participant obligatoriu în structura cromozomilor. În al doilea rînd, lucrarea cunoscuților savanți Watson și Crick apărută în 1953 a oferit cunoașterii următoarele date noi: a) structura bicatenară dublu-elicoidală a ADN și implicit a genei; b) modelul sintezei replicative semiconservative a ADN ca mecanism al autoreproducerii genei; c) ipoteza copierii eronate *(miscopying hypothesis)* ca bază moleculară a mutației genei și variabilității caracterelor. Aceste descoperiri, confirmate și completate printr-un volum enorm de lucrări ulterioare, au relevat în principiu mecanismele moleculare ale func-

Scanned with OKEN Scanner

ţiilor de ereditate şi de variabilitate, furnizînd modalităţile de gîndire, de concepere şi de interpretare ale modelelor experimentale din studiile eredităţii şi variabilităţii. În continuare dezvăluirea mecanismelor moleculare prin care genele determină caracterele (sau exprimarea fenotipică a genelor, sau expresia genică) s-a întemeiat insidios pe baza mai multor observaţii şi consideraţii ipotetice, desfăşurate între anii 1954 şi 1964. Considerentul teoretic reliefat în această perioadă ca principiu dominant a fost aplicarea teoriilor matematice ale sistemelor şi în particular a teoriei informaţiei în genetică (Gamow, 1954, Quastler, 1958). Deoarece teoria informaţiei tratează măsura şi căile prin care un eveniment este specificat a se produce dintr-o mulţime de evenimente posibile, s-a considerat că apariţia specificată a caracterelor în dezvoltarea ontogenică a organismelor este consecinţa activităţii unui sistem de specificare (de determinare specifică), explicabil prin trăsăturile unui sistem informaţional general. Pe baza acestui raţionament a luat naştere concepţia informaţiei genetice referitoare la determinarea genetică (specificarea) a caracterelor. Astfel, informaţia genetică s-a definit a fi o particularizare a informaţiei ca teorie generală de sistem, privind expresia genelor şi prezervarea potenţialului de exprimare genică în succesiunea de generaţii (tabelul 1 şi fig. 1).

Tabelul 1

Corespondenţa dintre trăsăturile teoriei generale a informaţiei şi trăsăturile caracteristice pentru teoria informaţiei genetice. Aşa cum rezultă din tabel, prin informaţie genetică se înţelege complexul de interacţiuni prin care ADN determină caracterele, le păstrează în succesiunea de generaţii şi asigură diversitatea lor.

Teoria generală a informaţiei	*Teoria informaţiei genetice*
Informaţia în teoriile de sistem este o modalitate de specificare a unei mulţimi de evenimente.	Informaţia genetică este modalitatea de a specifica diversitatea de aminoacizi în proteine şi implicit mulţimea de caractere.
Diversitatea de evenimente de specificat are o reprezentare simbolică determinantă.	Diversitatea de aminoacizi de specificat în proteine este considerată ca simbolizată de secvenţa dezoxiribonucleotidică din gene. Ultimele sînt determinante specifice pentru proteine (caractere).
Reprezentarea informaţiei privind o diversitate de evenimente formează cu cea din urmă un sistem informaţional de specificare.	Genele cu secvenţele lor dezoxiribonucleotidice formează cu proteinele şi diversitatea lor de aminoacizi un sistem de specificare, sistemul informaţional genetic.
Un sistem informaţional are purtători elementari ai informaţiei cu ajutorul cărora aceasta este păstrată şi eventual specifică diversitatea de evenimente reprezentate.	În sistemul informaţional genetic purtătorul elementar este considerat ADN (complexul de gene) care păstrează informaţia genetică în succesiunea de generaţii şi specifică diversitatea de aminoacizi din proteinele (caracterele) unui organism în condiţiile ontogenezei.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1 (continuare)

Teoria generală a informației	*Teoria informației genetice*
Un sistem informațional trebuie să aibă mijlocitori prin care purtătorii sînt relevanți pentru specificarea evenimentelor, adică un cod specific corespunzător acestor evenimente.	Sistemul informațional genetic are ca intermediari relevanți pentru specificarea aminoacizilor în proteine secvențele ribonucleotidice din ARN. Ribonucleotidele din ARN alcătuiesc un cod genetic.
Lista completă a elementelor care aparțin evenimentelor reprezentate în sistem.	Cei 20 de aminoacizi principali (codonici) specificați în proteine constituie lista completă a elementelor reprezentate în sistemul informațional genetic.

Atît datele experimentale privind rolurile ADN, ARN, proteinelor, cît și considerațiile teoretice coroborate cu modelările moleculare sterice au definit faptul că trăsăturile teoriei informației referite la un sistem general au corespondențe potrivite unei teorii informaționale care vizează un sistem informațional genetic (tabelul 1). Progresul adus de raționamentul informațional a fost uimitor.

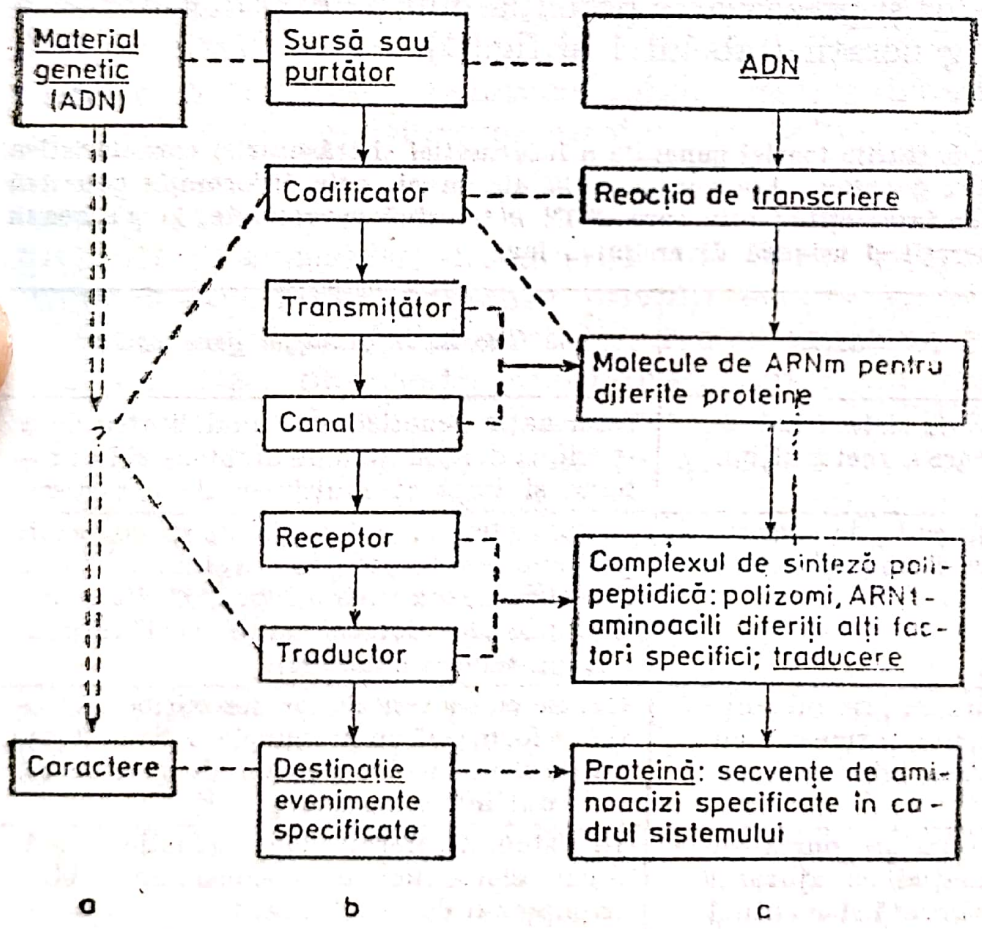


Fig. 1. Interpolarea componentelor unui sistem informațional general cu părțile constitutive ale sistemului informațional genetic; progresele aduse de aplicarea teoriei informației în explicarea determinismului genetic. a) Relația de expresie genică apriorică teoriei informației. b) Sistem informațional general. c) Sistemul informațional genetic.

Scanned with OKEN Scanner

Lucrări experimentale şi teoretice de o valoare excepţională au condus la descoperirea reacţiilor prin care secvenţele dezoxiribonucleotidice din ADN specifică proteinele înţelese ca fundament structural şi funcţional al caracterelor. Modelul informaţional general (fig. 1) a inspirat descoperirea codului genetic şi numeroase denumiri ale diferitelor componente şi reacţii biochimice intermediare: sursă de informaţie pentru ADN, mesager pentru ARN, transcriere pentru reacţia de sinteză a ARN, traducere sau citire pentru sinteza proteinelor. Înţelegerea expresiei genice devine un complex secvenţial de reacţii biochimice care se desfăşoară în cascadă avînd ca etapă finală sinteza de proteine specifice. Această cascadă de reacţii biochimice a fost etichetată drept un transfer de informaţie genetică de la ADN prin ARN la proteină, apărînd astfel conceptul central al biologiei contemporane exprimat prin relaţia unidirecţională: *ADN→ →ARN→proteină*. Numeroşi autori, mai scolastici, au denumit relaţia de transfer al informaţiei genetice *dogma centrală a biologiei moderne*, deşi modul de a raţiona nu este deloc dogmatic. Pentru facilitarea aspectului descriptiv al transferului de informaţie, cu tot riscul banalizării, s-ar putea recurge la personificări în care ADN „se face înţeles" prin intermediul unui mesaj transcris în ARNm, iar acesta la rîndul lui este „tradus" în secvenţe de aminoacizi din proteină, „dictînd" ordinea, felul şi numărul aminoacizilor care sînt încorporaţi în lanţurile polipeptidice ale proteinei (cap. IV şi VIII).

Căile şi modalităţile „de comunicare" intermoleculară în sistemul informaţional genetic au fost explicate de următoarele ipoteze confirmate prin numeroase rezultate experimentale: 1) împerecherea complementară specifică între bazele purinice şi pirimidinice ale lanţurilor polinucleotidice ca mod principal de specificare în reacţiile de replicare, de transcriere şi de traducere (cap. III, IV şi VIII); 2) existenţa de enzime catalizatoare ale reacţiilor de sinteză cu acceptare de molecule matriţe specifice preexistente; 3) ipoteza adaptorului de aminoacizi (cap. IV şi VIII); 4) codul genetic.

Codul genetic. Aşa cum rezultă şi din tabelul 1, în teoria informaţiei genetice se impunea precizarea modului în care secvenţa de ribonucleotide din ARN specifică secvenţa de aminoacizi din lanţurile polipeptidice ale proteinelor. Această necesitate a generat, mai întîi ipotetic, conceptul codului genetic. Conform teoriei generale a informaţiei, s-a considerat că cele patru tipuri de ribonucleotide din ARN constituie simbolurile care alcătuiesc alfabetul codului genetic. Pentru descriere, tipurile ribonucleotidice s-au simbolizat cu literele mari iniţiale ale bazelor purinice şi pirimidinice relevante pentru ribonucleotide: A = adenina, G = guanina, C = citozina, U = = uracil. Cum numărul de simboluri era mai mic decît numărul de aminoacizi de reprezentat şi de specificat, atunci s-a considerat că reprezentările aminoacidice în secvenţa poliribonucleotidică a unui

Scanned with OKEN Scanner

ARN este îndeplinită de grupe nucleotidice care corespund la aminoacizii dintr-o secvență polipeptidică. Potrivit acestei considerații, trebuie să existe cel puțin 20 de grupe distincte care să corespundă la cei 20 de aminoacizi participanți primari în sinteza de proteine. Grupele nucleotidice din ARN au fost numite „cuvinte de cod" iar mai tîrziu, codoni. Numărul total de codoni care corespund la diversitatea de aminoacizi a fost numit codul genetic. După dispute teoretice ilustrate în diferite publicații apărute între 1954 și 1961, urmate de date decisive aduse de Crick și colab. (1961), Nirenberg și Matthaei (1961), Nirenberg și colab. (1964, 1965), s-au stabilit definitiv următoarele caracteristici ale codului genetic.

a) Codul genetic este triplet ; cuvîntul de cod sau codonul corespunzător unui aminoacid este format din trei ribonucleotide adiacente.

b) Dicționarul codului genetic, adică numărul total de codoni definiți, este de 64.

c) Codul genetic este neacoperit. Prin aceasta se înțelege că într-o înșiruire codonică, niciodată doi codoni adiacenți nu au comun un nucleotid și nicidecum nu pot avea în comun două nucleotide, adică „nu se acoperă".

d) Codul genetic este degenerat, în sensul că la un aminoacid corespund mai mulți codoni (tabelul 2).

Tabelul 2

Codul genetic (dicționarul de codoni și aminoacizii corespunzători). (Reprodus după Allison, 1972). Codonii nonsens sînt și terminatori (term) iar codonul AUG, pe lîngă funcția de a specifica metionina, îndeplinește și rolul universal de codon inițiator. Simbolurile aminoacizilor codonici : Phe = fenilalanină ; Leu = leucină ; Ile = izoleucină; Met = metionină ; Val = valină ; Ser = serină ; Pro = prolină ; Thr = treonină ; Ala = = alanină ; Try = triptofan ; Tyr = tirozină ; His = histidină ; Gln = glutamină ; Asn = asparagină ; Glu = acid glutamic ; Asp = acid aspartic ; Lys = lizină ; Arg = = arginină ; Cys = cisteină ; Gly = glicină. Se folosesc simbolizările internaționale utilizate ca atare în toate capitolele următoare.

Primul nucleotid	Al doilea nucleotid								Al treilea nucleotid
	U		C		A		G		
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA		UCA		UAA	term	UGA	term	A
	UUG		UCG		UAG	term	UGG	Try	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA		CCA		CAA	Gln	CGA		A
	CUG		CCG		CAG		CGG		G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC		ACC		AAC		AGC		C
	AUA		ACA		AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met	ACG		AAG		AGG		G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC		GCC		GAG		GGC		C
	GUA		GCA		GAA	Glu	GGA		A
	GUG		GCG		GAG		GGG		G

Scanned with OKEN Scanner

e) Din totalul de 64 de codoni numai 61 corespund la aminoacizi, tul de trei codoni nu specifică aminoacizi, de aceea au fost numiți codoni nonsens. S-a dovedit apoi pentru cei trei codoni nonsens, UAA, UAG, UGA, un rol deosebit în terminarea sintezei unui lanț polipeptidic (cap. VIII).

f) Din cele trei litere ale codonului, litera a treia prezintă un aspect oscilatoriu în specificarea aminoacizilor, de aceea codul genetic are un caracter semisistematizat corelat cu fenomenul de degenerare (Crick, 1966 a, b).

g) Codul genetic este fără virgulă, adică delimitarea dintre codoni într-o secvență polinucleotidică nu este dată de un interspațiu (o bază în plus sau supraadăugarea altei structuri chimice). Delimitarea ia naștere din semnificația informațională de specificare la raportul de cod 3 ribonucleotide/1 aminoacid, în care specificarea aminoacizilor sau citirea codonilor are loc unidirecțional (cap. VIII).

h) Codul genetic nu este ambiguu, în sensul că un singur codon nu corespunde la doi sau mai mulți aminoacizi.

i) Codul genetic este universal. Codonii care-l alcătuiesc au aceeași semnificație indiferent de specie. De exemplu, codonul UUU specifică încorporarea fenilalaninei atît la procariote, cît și la eucariote.

j) Secvențele de codoni din ARNm alcătuiesc mesajul genetic; acesta este diferit de la o proteină la alta, de la un caracter la altul, de la o specie la alta. Mesajul genetic este tradus sau citit unidirecțional.

k) Secvențele de codoni din ARNm sînt transcrieri ale secvențelor de triplete dezoxiribonucleotidice din ADN.

l) Codonii specifică aminoacizii prin intermediul tipurilor diferite de ARNt. Molecula ARNt are o tripletă nucleotidică a cărei secvență este complementară unui codon, denumită din acest motiv anticodon.

Demonstrarea existenței codului genetic a fundamentat conceptul central al biologiei moderne ilustrat prin relația ADN → ARN → → proteină ca bază a expresiei genice. Cei 20 de aminoacizi care au codoni corespunzători lor în dicționarul codului genetic sînt numiți codonici pentru a-i deosebi de alți aminoacizi din structura proteinelor (hidroxiprolina, hidroxilizina) fără corespondențe de cod. Aminoacizii codonici nu pot fi numiți esențiali. Termenul de aminoacid esențial este de domeniul cerințelor nutritiv-metabolice și semnifică aminoacizii care nu pot fi sintetizați de un organism, motiv pentru care sînt esențial necesari în aportul nutritiv. Numărul de aminoacizi esențiali este taxonomic eterogen; de exemplu, pentru om sînt 10 aminoacizi esențiali, pentru *E. coli* de tip sălbatic nici un aminoacid nu este esențial, deoarece echipamentul enzimatic al acestei bacterii permite sinteza tuturor aminoacizilor din structura proteinelor proprii.

Scanned with OKEN Scanner

În același timp cu preocupările privind analiza experimentală a ADN ca bază structurală a genelor și a ARN ca intermediar de transfer al informației genetice, analiza structurală a proteinelor a atins niveluri superioare. Conform principiului premolecular al geneticii referitor la corespondența dintre gene și caracterele fenotipice, analizele moleculare ale proteinelor, în particular determinarea secvențelor de aminoacizi, au furnizat date de mare importanță pentru precizarea corespondențelor dintre codoni și aminoacizi. Secvențierea aminoacizilor combinată cu metodele clasice de analiză statistică a evenimentelor de mutație și recombinare au adus contribuții deosebite la fundamentarea geneticii moleculare: 1) s-a precizat că transcrierea și citirea genei sînt secvențiale și unidirecționale, adică gena și lanțul polipeptidic corespunzător sînt coliniare; 2) codonilor nonsens cu semnificația de a specifica terminarea în sinteza unui polipeptid li s-au stabilit secvențele trinucleotidice corespunzătoare și au fost denumiți codoni terminatori (tabelul 2); 3) analizele aprofundate ale structurii proteinelor corelate cu datele asupra transferului informațional au demonstrat că numeroase proteine funcționale sînt alcătuite eterogen, o moleculă proteinică fiind formată din lanțuri polipeptidice diferite specificate de segmente diferite de ADN. Se impunea astfel modificarea corespondenței premoleculare o genă — o enzimă (o genă — o proteină). Noile observații din acea perioadă defineau o altă corespondență biunivocă informațională, o genă — un lanț polipeptidic. Noua concepție a fost fundamentată și prin analizele genetice statistice ale populațiilor de bacteriofagi cu schimbări mutaționale multiple localizate într-un segment genetic considerat pînă atunci unitar (regiunea rII a fagului T4). Deoarece demonstrarea genetică s-a efectuat cu testul clasic cis-trans (cap. XII), unitatea de material genetic corespunzătoare unui lanț polipeptidic a fost denumită cistron, termen în mare parte înlocuit cu noțiunea de genă reconsiderată pe baza conceptului o genă — un lanț polipeptidic.

Transferul informațional exprimat prin relația fundamentală ADN-ARN-proteină a fost numit și codificare, noțiune cinetică legată concret de specificarea actuală a sintezei de proteine, prin codificare înțelegîndu-se totalitatea reacțiilor de transcriere și traducere care au ca rezultat sinteza de lanțuri polipeptidice. În mod frecvent, termenul de codificare este utilizat pentru a ilustra capacitatea genelor de a păstra informația genetică prin „codoni ADN". Acest sens este însă neconform sistemului informațional genetic (tabelul 1, fig. 1); secvența nucleotidică din ADN conservă informația genetică iar procesul de codificare este conversia informației în secvențe de codoni și secvențe de aminoacizi. Codonii sînt numai triplete ARN.

Raporturile transferului de informație de tipul un codon/un aminoacid, o genă/un lanț polipeptidic exprimă calitativ relația de codi-

Scanned with OKEN Scanner

ficare. Teoria informației genetice inițial s-a preocupat numai de modalitatea în care sînt specificate lanțuri polipeptidice diverse din diferitele proteine funcționale. De timpuriu, în cadrul preocupărilor de ordin calitativ, s-au efectuat studii moleculare vizînd exprimarea cantitativă a diferitelor codificări. În raportul cantitativ de codificare relația nu mai este biunivocă, o genă dată — un singur lanț polipeptidic. În mod majoritar, o genă corespunzătoare unui polipeptid codifică mai multe lanțuri polipeptidice de același fel, transferul informațional fiind o amplificare cantitativă. În plus, s-a observat că în ciclul de viață al fiecărei forme de organizare a materiei vii, de la virusuri și pînă la eucariotele superioare, nu sînt codificate toate proteinele dintr-o dată. Există o programare, pe etape, a codificărilor diverse. Unele proteine sînt codificate sub acțiunea inductoare a factorilor de mediu, iar pentru altele codificarea este represată tot printr-o acțiune ecologică. La organismele pluricelulare, programarea codificărilor atinge nivele foarte ridicate exprimate prin specializări celulare ireversibile în grupări celulare, țesuturi și organe net diferențiate structural și funcțional. Dintre numeroasele probleme ale controlului cantitativ și ale diferențierii, primele studii moleculare au vizat inducția și represia ecologică la bacterii, atît procesele cît și organismele fiind mai puțin complexe. Studiile biochimice și genetice asupra enzimelor care metabolizează lactoza (Jacob și Monod, 1961) au demonstrat clar existența de gene cu funcția de a controla cantitativ transferul informațional. Activările genice și inactivările din diferențiere sînt mai complicate decît inducția — represia enzimatică, se află în „stare născîndă" a procesului de cunoaștere la nivel molecular și vor fi abordate ca progrese recente ale geneticii în capitolul X.

În rezumat, fundamentarea geneticii moleculare s-a înfăptuit prin precizarea naturii și structurii genelor, unități bazale ale funcțiilor de ereditate, variabilitate și ale controlului calitativ și cantitativ în expresia genelor. Înțelegerea expresiei genice prin codificare, adică prin transferul informațional ADN → ARN → proteină, a constituit și constituie coloana vertebrală de principiu a aprofundării recente în cunoașterea mecanismelor moleculare ale geneticii.

Genetica moleculară a adus o creștere revoluționară a cunoașterii în biologia generală și are posibilități de fructificare în domenii aplicative de mare interes pentru progresul material și științific al civilizației. Cercetările moleculare de genetică au confirmat și au dat noi dimensiuni principiilor clasice. Continuitatea de concepție, stabilitatea principiilor, confirmarea experimentală a previziunilor antemoleculare atestă caracterul axiomatic în cunoașterea fenomenelor geneticii la nivel molecular.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul II

MACROMOLECULE INFORMAȚIONALE

Compușii biochimici cu o greutate moleculară de peste 10 000 de daltoni fac parte din grupul macromoleculelor. În acest grup sînt cuprinse o multitudine de componente constitutive pentru viețuitoare, ca: numeroase polizaharide, complexe lipidice și lipoproteinice, marea majoritate a proteinelor și acizii nucleici. Nu toate macromoleculele biologice sînt însă informaționale. Calitatea informațională o au numai acele macromolecule care în expresia genică participă nemijlocit în transferul de informație de la nivelul genelor la nivelul caracterelor corespunzătoare acestora.

Conform relației ADN → ARN → proteină, considerată fundament al expresiei genice, transferul de informație genetică s-ar termina la nivelul moleculelor proteinice ca destinatare finale. Proteinele constituie baza structural-funcțională a caracterelor, dar acestea nu se rezumă exclusiv structural și funcțional numai la proteine. Majoritatea caracterelor morfologice, fiziologice și biochimice participante la alcătuirea unei viețuitoare sînt subansamble specifice constante, la formarea cărora concură pe lîngă proteine și alți compuși, ca: lipide, derivați glucidici, micromolecule organice diverse, săruri anorganice. Asamblarea acestor componente într-un caracter particular (de exemplu, formarea membranei citoplasmatice) este determinată specific de funcțiile multivalente ale proteinelor: structurale, enzimatice, de transport, hormonale, de sistem tampon în menținerea constantă a valorilor de *p*H, de menținere a presiunii osmotice, de receptori specifici. Aceste funcții ale proteinelor, exercitate cu specificitate, sînt expresiile secvențelor particulare ale aminoacizilor care le alcătuiesc. Secvențele aminoacidice particulare sînt specificate prin codificare. Astfel, informația genetică transferată prin codificare în secvența de aminoacizi din proteină este purtată prin activitatea specifică la nivelul caracterelor complexe: formarea lipidelor de membrană, producerea de fosfatide în neuroni, constituirea arhitectonicii celulare. Ca urmare, proteinele transferă la rîndul lor informația genetică la nivelul caracterelor complexe și în consecință sînt macromolecule informaționale. În acest context, relația de trans-

Scanned with OKEN Scanner

fer a informației genetice devine: *ADN → ARN → proteine → caractere de complexitate diversă.* Proteinele sînt și destinatar și transmițător, deoarece sînt participante atît în alcătuirea caracterelor complexe, cît și în specificarea celorlalte componente cu care proteinele interacționează în finisarea lor.

Participarea ADN, ARN și proteinelor în transferul de informație are loc într-o înlănțuire de trei etape reacționale: (1) etapa de transcriere în care secvențele dezoxinucleotidice din ADN au rolul de a specifica secvențele ribonucleotidice din ARN; 2) etapa de traducere; secvențele ribonucleotidice din ARN „dictează" secvențele de aminoacizi din lanțurile polipeptidice ale proteinelor; 3) etapa de finisare a caracterelor complexe în care proteinele, prin activitățile lor multiple, definitivează ansamblul de caractere specifice organismelor. Deși diferențele de structură și funcție dintre diferitele macromolecule informaționale sînt nete și în mare parte bine cunoscute, totuși există numeroase trăsături comune care sînt utilizate frecvent în sens descriptiv și totodată au semnificații profunde în interacțiunile funcționale.

1. **Trăsăturile comune ale macromoleculelor informaționale.** 1. *Sînt polimeri ai unor micromolecule precursoare și au bazal o structură filiformă.* Așa cum se ilustrează în fig. 2, ADN este un polimer de dezoxinucleotide monofosfați conectați prin legături fosfodiesterice. ARN este format din ribonucleotide monofosfați legați tot fosfodiesteric, iar proteinele sînt bazal formate din lanțuri polipeptidice alcătuite din secvențe de aminoacizi legați între ei prin legătura peptidică. Dezoxinucleotidele, ribonucleotidele și aminoacizii se numesc precursori deoarece sînt predecesori liberi necesari sintezei care generează macromoleculele corespunzătoare. Înainte de participare în sinteza macromoleculară, precursorii sînt activați prin formarea de complexe posesoare de legături macroergice. Aflați în macromolecule, precursorii sînt numiți resturi sau reziduuri, deoarece prin hidroliza polimerilor, în locul acestora rămîn ca „reziduuri" dezoxinucleotide, ribonucleotide și respectiv aminoacizi. Structura bazală monocatenară este filiformă pentru că raportul diametrul grosimii/lungime este cel mai adesea mai mic decît 1/100.

2. *Structura lor bazală este monocatenară fără ramificații; fiecare lanț are două extremități distincte.* ADN, ARN cît și proteinele au o structură bazală monocatenară polidezoxinucleotidică, poliribonucleotidică, respectiv polipeptidică, fără a prezenta ramificații care să contribuie la formarea de structuri supraadăugate tridimensionale. Unitatea bazală macromoleculară este deci un lanț polimeric (o monocatenă); aceasta prezintă două extremități distincte, deosebite prin grupări funcționale terminale care nu mai participă la stabilirea de legături covalente formate între resturile fie nucleotidice, fie amino-

Scanned with OKEN Scanner

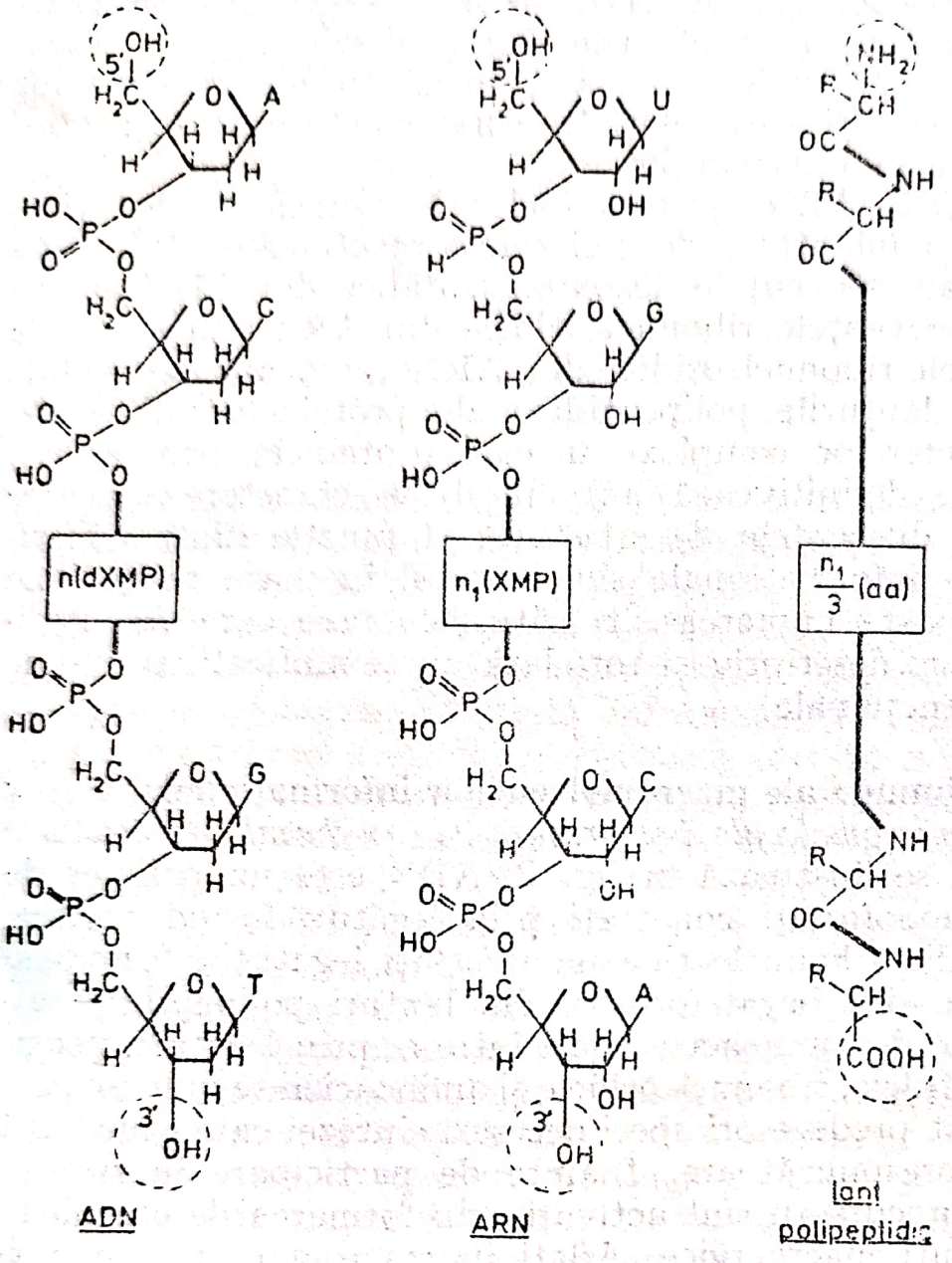


Fig. 2. Structurile monocatenare bazale ale macromoleculelor informaționale și extremitățile acestora. n(dXMP) ⩾ 300 dezoxiribonucleotide; n_1(XMP) ⩾ 300 ribonucleotide; $n_1/3$(AA) ⩾ 100 de resturi aminoacil. Cele trei scheme ilustrează și corespondența clasică de codificare în care raportul de transcriere este biunivoc iar raportul de traducere este de 3/1 (cap. IV și VIII).

acidice. Deoarece legăturile covalente repetate internucleotidice sînt fosfodiesterice și angajează numai grupările oxidrilice din pozițiile glucidice C—5′ și C—3′, atunci pentru acizii nucleici extremitățile au obligatoriu un oxidril —5′ terminal și respectiv un oxidril — 3′ terminal, neparticipanți în legături fosfodiesterice (fig. 2). Acești doi oxidrili terminali sînt la originea denumirilor date extremităților, adică *5′* și *3′*. Adesea cei doi oxidrili pot fi monoesterificați cu un rest fosforic. Pentru lanțurile polipeptidice ale proteinelor se disting

Scanned with OKEN Scanner

extremitățile aminică și carboxilică sau aminoterminală și, respectiv, carboxiterminală (fig. 2). Lanțul polipeptidic este descris și orientat pornind de la extremitatea aminoterminală. Notarea resturilor aminoacil dintr-o secvență polipeptidică se face cu un șir discret de cifre arabe 1, 2, 3, 4, 5, ..., în care aminoacilul constituent al extremității amino este numărul 1 iar aminoacilul constituent al extremității carboxi poartă ultimul număr al șirului și indică și numărul total de aminoacili participanți în alcătuirea secvenței polipeptidice referite. Pentru precizarea raporturilor dintre diferite segmente în multe cazuri lanțul polipeptidic este împărțit în zone sau domenii. De exemplu, lanțurile hemoglobinice sînt împărțite în zone notate de la A la H, lanțurile imunoglobulinice în domenii.

3. *Au o mare diversitate și prezintă un potențial extraordinar de diversificare furnizat de secvențializarea resturilor fie nucleotidil, fie aminoacil.* Monocatenele polinucleotidice naturale au cel puțin 80 de resturi nucleotidil iar cele polipeptidice, cel puțin 30 de resturi aminoacil (cu excepția unor peptide de tipul celor hipotalamice sau antibioticelor peptidice). Numărul, felul și ordinea resturilor în secvență determină existența de macromolecule cu proprietăți fizicochimice și biologice diferite. Considerînd posibilitățile de interconectare a patru resturi nucleotidil diferite în macromolecule cu sute și mii de asemenea resturi, diversitatea moleculară atinge valori enorme. Pentru proteine, diversitățile reală și cea potențială sînt foarte mari datorită numărului mai mare de aminoacizi diferiți participanți în alcătuirea macromoleculelor, cît și a diferențelor structurale foarte accentuate între diverșii aminoacizi. Diversitatea moleculară mai este amplificată și de procesele de prelucrare care au loc în finisarea macromoleculelor informaționale, cît și de ansamblul de interacțiuni dezvoltate în formele viețuitoare. Prin această diversitate macromoleculele informaționale se comportă conform unui principiu definitoriu pentru teoria generală a informației, în care diversitatea este considerată ca o calitate a capacității unui sistem informațional de a specifica, de a fi relevant pentru o mulțime de evenimente. Mulțimea de evenimente în cazul informației genetice este concretizată în mulțimea de caractere din ansamblul viețuitoarelor.

4. *Unitățile monocatenare alcătuiesc structuri supraadăugate prin replieri și înfășurări intracatenare și prin agregări intercatenare. Structurile supraadăugate sînt menținute cel mai adesea de legături de slabă energie (necovalente)* (cap. III, X). În afară de o parte din proteinele care își stabilizează structurile supraadăugate atît prin legături necovalente, cît și prin legături covalente (cap. IX), majoritatea macromoleculelor informaționale se suprastructuralizează prin formarea de legături necovalente (legăturile de hidrogen, forțele de atracție ionică, forțele de atracție Van der Waals, legăturile apolare, legăturile de stivuire, legăturile cu

Scanned with OKEN Scanner

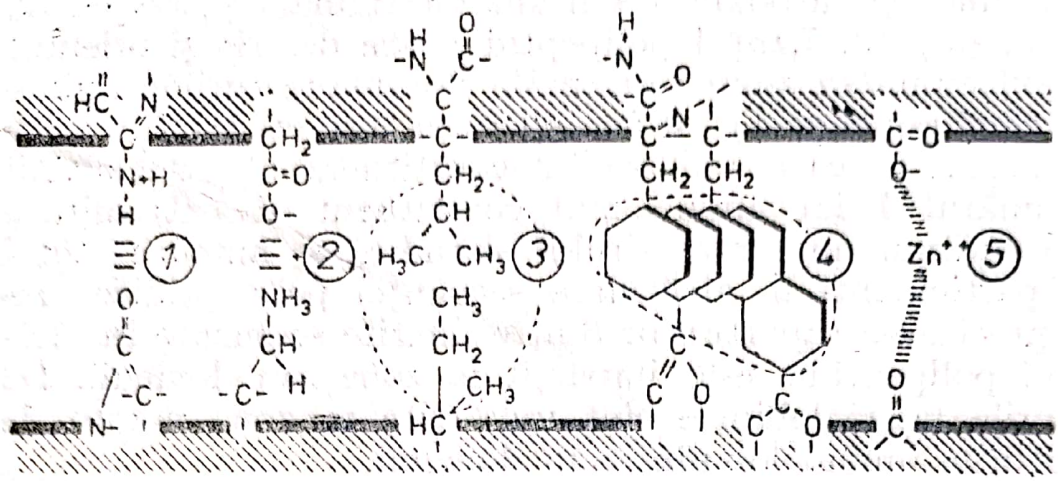


Fig. 3. **Legături de slabă energie (necovalente).** 1—**legătura de hidrogen** între oxigenul unui grup carbonil şi hidrogenul unei grupări amino. 2 — **legătură ionică** (numită şi legătură de sare sau electrostatică) stabilită între un grup carboxil şi o grupare amino, ambele în stare ionizată. 3 — **Forţă de atracţie Van der Waals** stabilită între porţiunile hidrofobe aparţinînd la doi aminoacizi amfipatici (gr. amphi = ambele, patos = = afinitate; compuşi cu două porţiuni, una hidrofilă formatoare de legături dipol şi alta hidrofobă, apolară). Porţiunile apolare în mediu apos manifestă afinitate unele faţă de altele stabilind grupări de forţe Van der Waals desemnate drept **legături apolare.** Ca urmare acestea pot fi definite ca ansambluri de atracţii Van der Waals între grupări hidrofobe (de exemplu, legături apolare între segmente polipeptidice bogate în aminoacizi amfipatici). 4 — **legături de stivuire:** ansambluri de atracţii Van der Waals favorizate de intercalarea în „stivă" de structuri plane (de exemplu, cicluri ale aminoacizilor aromatici din proteină şi cicluri purinice şi pirimidinice dintr-un polinucleotid). 5 — **Forţe de legare cu participare de ioni metalici,** cofactori de interacţiune între macromolecule.

participare metalică) (fig. 3). Aceste legături, de importanţă esenţială pentru structura şi funcţiile macromoleculelor informaţionale (Watson, 1974), au cîteva caracteristici importante: 1) Energia lor de legare este de 25—100 de ori mai slabă decît legătura covalentă; 2) Între legăturile necovalente există o ierarhizare energetică: legătura ionică > legătura de hidrogen > legătura Van der Waals. Legăturile mai puternice exclud energetic formarea legăturilor mai slabe în locul în care primele s-au stabilit. De exemplu, stabilirea legăturilor de hidrogen între bazele unei molecule de ADN face improbabilă existenţa şi de forţe Van der Waals la acelaşi nivel; 3) Existenţa şi numărul lor nu sînt condiţionate de valenţă, ci de configuraţia sterică a atomilor angajaţi în stabilirea lor; 4) Sînt importante ca energie de legare (şi în consecinţă mai puţin labile) cînd se găsesc în grupări sistematizate şi se dezvoltă între suprafeţe moleculare care se potrivesc. Forţa lor este semnificativă, de exemplu, în cazul structurilor sterice complementare (catenele complementare ale ADN bicatenar) sau a suprafeţelor cu forme complementare; 5) Au unghiuri variabile ceea ce conferă moleculei sau agregatelor multimoleculare un mare grad de flexibilitate. 6) Se refac sau se desfac imediat ce condiţiile de distanţă inter-

Scanned with OKEN Scanner

atomică se schimbă în raport cu modificările conformaționale ale macromoleculei; ruperea lor nu necesită biocataliză cînd sînt grupe mici; dacă sînt în grupe mari sistematizate ca în cazul ADN bicatenar (fig. 4), pentru desfacerea lor este necesară biocataliza, deoarece s-au descris enzime destabilizatoare; 7) Distribuția lor dependentă de configurația sterică poate fi în ansamblu specifică, ea generînd împerecheri specifice; acestea constituie mecanismul fundamental al transferului de informație; 8) Constituie forțele bazale de agregare a diferitelor molecule în ansambluri structurale etajate: structuri subcelulare, asamblarea acestora în celule, celulele în țesuturi, țesuturile în organe și sisteme, organele și sistemele în organisme unitare; 9) Constituie forțele cu distribuție sterică specifică aflate la baza interacțiunii enzimă — coenzimă, enzimă — substrat, antigen — anticorp.

5. *Biosintezele macromoleculelor informaționale constituie mecanismele conservării ereditare a informației genetice și a transferului acesteia în procesul complex al expresiei genice.* *Biosintezele de macro-*

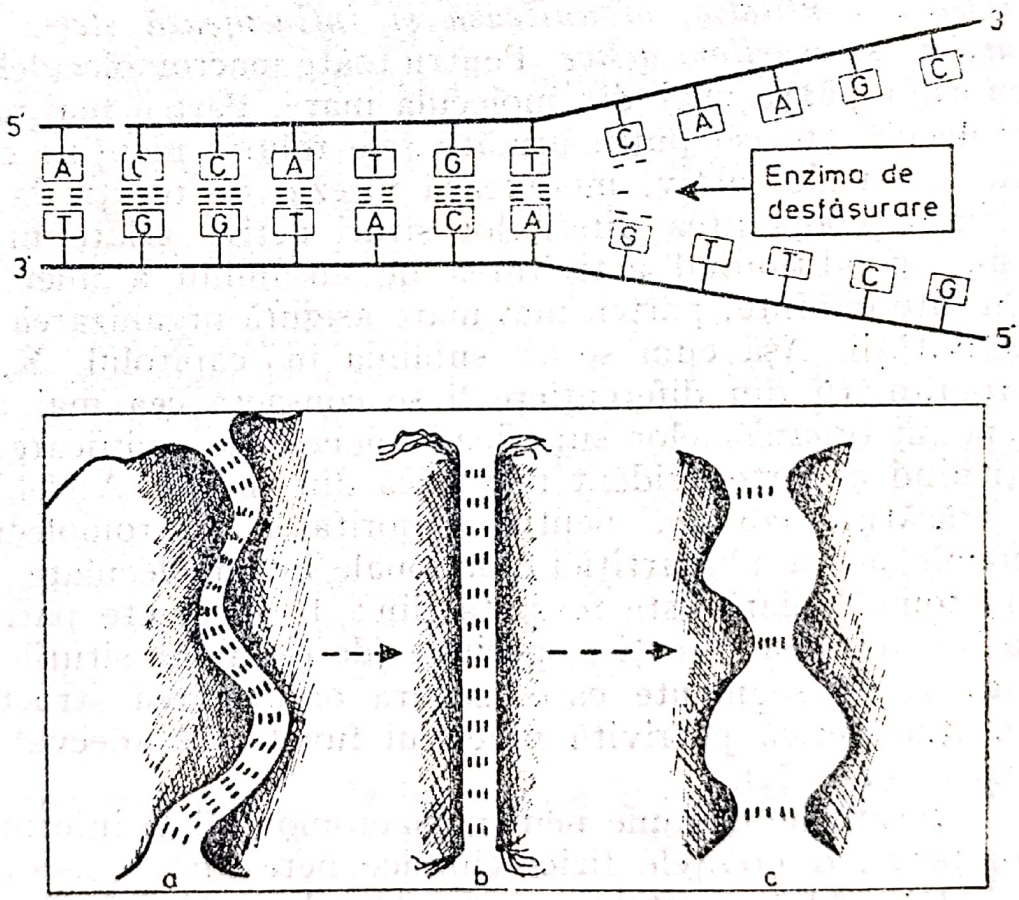


Fig. 4. Legături de slabă energie stabilite între macromolecule complementare. Sus, un fragment de ADN bicatenar în care ansamblul de forțe slabe (legături de hidrogen) dezvoltă o energie semnificativă de legare, învinsă catalitic de o enzimă ATP-dependentă (cap. III). Jos se ilustrează importanța complementarității cavitate-proeminență sau interplană în stabilirea de ansambluri energetic semnificative (a, b). Absența de profiluri complementare conduce la formarea de legături singulare energetic nesemnificative (c).

Scanned with OKEN Scanner

molecule sînt formate dintr-o cascadă de reacţii, cu etape şi trăsături comune. a) Necesită macromolecule preformate cu funcţia de matriţă *(template)*. b) Precursorii sintetizaţi de novo sau proveniţi prin aport nutritiv sînt prelucraţi energetic şi activaţi. Sursa de energie pentru activarea precursorilor este în general ATP. *c*) Sinteza propriu-zisă constă din încorporarea precursorilor într-o structură monocatenară; precursorii sînt încorporaţi unul după altul şi nu concomitent. Această încorporare are trei etape distincte: *de iniţiere, de elongaţie* şi *de terminare.* Încorporarea de precursori micromoleculari formează în mod obişnuit lanţuri brute nefuncţionale denumite macromolecule precursoare. d) Prelucrarea, finisarea şi ajustarea macromoleculelor precursoare. Formarea de macromolecule „mature" capabile de a exercita funcţiile specifice. Această etapă poate fi parţial intricată cu procesul de încorporare şi să vizeze lanţul născînd al macromoleculei în sinteză.

6. *Macromoleculele informaţionale au situri active (centri activi) implicate direct în exercitarea funcţiilor specifice iar restul molecular reglează cantitativ, organizează şi influenţează steric participarea siturilor (situsurilor) active.* Pentru toate macromoleculele siturile active cuprind părţi mici din molecula mare. Partea mai mare din macromoleculă are cel puţin următoarele roluri: menţine configuraţia sterică a sitului activ, modulează viteza de reacţie la nivelul sitului, asigură cooperarea diferitelor situri active aflate în aceeaşi moleculă condiţionînd activitatea de ansamblu a unei macromolecule. Cu alte cuvinte, partea mai mare asigură organizarea şi programarea activităţii. Aşa cum se va sublinia în capitolul X, organizării şi programării din diferenţiere li se consacră cea mai mare parte din genomii organismelor superioare, genele de codificare calitativă constituind o parte evident mai mică din genom. Astfel, se delimitează o trăsătură comună pentru majoritatea macromoleculelor informaţionale, aceea a bipartiţiei funcţionale intramoleculare. Adică unitatea macromoleculară este formată din: 1) segmente participante direct în exercitarea funcţiei specifice (de exemplu, siturile active ale enzimei); 2) segmente care asigură organizarea structurală şi configuraţia sterică potrivită nivelului funcţional adecvat cerinţelor biologice (cap. X).

Trăsăturile comune pentru macromoleculele informaţionale nu estompează diferenţele fizico-chimice nete dintre cele trei categorii — — ADN, ARN, proteine — şi nici rolurile lor în stocarea informaţiei genetice şi în expresia genică. Dacă ADN (şi ARN în cazul virusurilor ARN) au un rol definit în păstrarea informaţiei, nu există însă pînă în prezent vreo observaţie care să sugereze că proteina ar putea avea rol de matriţă în transferul informaţional şi, în consecinţă, structurile proteinice nu au capacitatea de stocare a informaţiei (Watson, 1974).

Scanned with OKEN Scanner

2. **Interacțiunile dintre macromoleculele informaționale constituie și baza structurală a organitelor, celulelor și țesuturilor.** Macromoleculele informaționale au proprietatea de a se agrega între ele și formează complexe eterogene caracteristice. Spre deosebire de proteine, acizii nucleici singuri nu pot realiza forme globulare. Formele de asamblare globulară s-au dovedit a fi optimale pentru configurația sterică potrivită activităților în care se exercită și modulări cantitative (cap. X). Pentru realizarea formelor globulare posesoare de acizi nucleici sînt proteine specializate (histone, protamine, proteine ribozomale), caracterizate prin afinitate preferențială față de aceștia.

Alături de complexele eterogene proteină — ARN și proteină — — ADN se află și moleculele hibride ARN—ADN caracterizate printr-o structură bicatenară în care o monocatenă ARN este împerecheată prin legături de hidrogen cu o monocatenă complementară de ADN. Importanța hibrizilor moleculari ARN—ADN rezidă în numeroasele implicații experimentale și funcționale ale acestora, printre care demonstrarea reacției de transcriere, localizarea moleculară a genelor în diferiți cromozomi, sinteza de gene pure, reacțiile de transcriere inversă (cap. V, XII, XIV).

Deși proteinele sînt macromolecule informaționale, numeroase tipuri specializate participă în configurația structurală a organismelor: alcătuiesc membrane celulare, constituie travee conjunctive, trabecule osoase, carcasa chitinoasă a insectelor, mase musculare. Pe scurt, alcătuiesc fundamentul structural al unui organism. Într-o măsură asemănătoare, și acizii nucleici — pe lîngă calitatea informațională — exercită și funcții structurale (cap. VII).

În ciuda tendinței generale a materiei vii de a folosi în mod economic resursele energetice, cerințele plurivalente pentru sinteza macromoleculelor informaționale determină ca viețuitoarele să cheltuiască multă energie pentru construirea acestor macromolecule în condiții arhitectonice specifice, pretențioase, dar vital necesare. Astfel, încorporarea specifică a unui aminoacid într-o secvență particulară consumă cel puțin 28 Kcal mol^{-1} iar încorporarea unui precursor nucleotidil nu oricum, ci într-o poziție specifică solicită aproximativ 15 Kcal mol^{-1}.

3. **Interacțiunea transferului de informație în expresia genică perpetuă a macromoleculelor informaționale.** Fiecare lanț polipeptidic calitativ diferit își are o genă corespunzătoare care îl codifică. Astfel, perpetuarea exprimării proteinelor și caracterelor în succesiunea de generații este asigurată de codificare. Dar celelalte macromolecule informaționale ADN, ARN, sînt expresii genice? Cu alte cuvinte, există gene a căror expresie este sinteza de gene (sinteza de ADN)? Întrucît genele (segmentele de ADN care le alcătuiesc) sînt produse obișnuite, antrenate în metabolismul primar cu funcțiile lor carac-

Scanned with OKEN Scanner

teristice, ele nu fac excepție de la relația generală de transfer informațional. Fiecare genom are gene ale căror produse (enzime, factori de control) îndeplinesc sinteza genomului însuși ca un caracter complex finisat. Folosind limbajul geneticii clasice, macromoleculele informaționale sînt fenotipuri ale genelor specializate să le codifice sau, cu alte cuvinte, cromozomii și genele pe care le conțin sînt expresii fenotipice ale genelor pentru perpetuarea „cromozomilor și genelor". În consecință, ADN însuși constituie un caracter complex rezultat dintr-o relație de transfer informațional a cărei expresie fenotipică este sinteza de ADN (cap. III).

În concluzie, sînt trei categorii de macromolecule genetic informaționale: ADN, ARN și proteine. Acestea asigură perpetuarea ereditară a organismelor și expresia genică prin codificarea caracterelor complexe. Macromoleculele informaționale mai participă în îndeplinirea altor funcții de importanță majoră, printre care se situează status-ul structural. Pe lîngă trăsăturile care le diferențiază, macromoleculele informaționale au mai multe caracteristici comune: o structură bazală monocatenară fără ramificații; extremități distincte; manifestă o mare diversitate actuală și potențială; unitățile monocatenare pot forma structuri tridimensionale prin agregări omoloage (participă monocatene ale aceleiași categorii de macromolecule) sau eteroloage (agregări proteine — ARN, proteine — ADN, ARN —ADN); au situri active și porțiuni moleculare pentru organizare și control; majoritatea macromoleculelor informaționale au această conformație sterică bifuncțională subliniată ca un principiu al bipartiției funcționale intramoleculare; biosintezele diverselor macromolecule au căi complexe diferite, dar cu etape analoage de organizare.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul III

STRUCTURA ACIDULUI DEZOXIRIBONUCLEIC (ADN), COMPOZIȚIE CHIMICĂ ȘI ARHITECTURĂ MOLECULARĂ. BIOSINTEZA REPLICATIVĂ A ADN

1. **Compoziția chimică a ADN.** ADN este o macromoleculă informațională polimerică a cărei unitate (monomer) este nucleotidul, el însuși o moleculă complexă formată dintr-o bază purinică sau pirimidinică, zahăr pentozic (2-dezoxi-D-riboza) și acidul fosforic.

ADN este suportul fizic al informației genetice, fundament al conservării, reproducerii și evoluției speciilor. Funcția sa de substanță ereditară (Avery și colab., 1944) este dovedită și de constanța conținutului său în diferitele țesuturi somatice ale aceluiași organism (cu unele excepții nesemnificative). Conținutul de ADN este însă variabil de la o specie la alta. În ciclul celular al organismelor diploide cantitatea de ADN este diploidă (2C) în stadiul presintetic (G_1), se dublează la sfîrșitul stadiului de sinteză (S) cînd atinge nivelul tetraploid (4C), rămînînd la acest nivel în stadiul postsintetic (G_2) și este repartizată echilibrat prin mecanismul mitotic în celulele fiice, care astfel primesc aceeași cantitate de informație genetică pe care a avut-o celula inițială.

Cantitatea de ADN este dublă în celulele somatice față de celulele reproducătoare.

ADN manifestă o remarcabilă stabilitate biochimică-metabolică, fiind unul dintre cele mai stabile componente macromoleculare ale celulei. Acest fapt nu înseamnă că el este absolut inert. Avînd structură polimerică, este posibilă înscrierea în macromolecula de ADN, sub forma unor secvențe de baze azotate specifice fiecărei specii, a unei cantități enorme de informație genetică. Numai o catenă infimă de circa 100 nucleotide poate fi construită sub forma a 4^{100} variante diferite (4 reprezentînd tipurile diferite de baze azotate), putîndu-se astfel explica enormele posibilități de realizare a variațiilor calitative și cantitative (tabelul nr. 3) intra- și inter-specifice, bazate pe structura polimerică a macromoleculei ADN. Atît în structura ADN, cît și a ARN intră patru baze azotate diferite (denumirea de bază vine de la caracterul bazic conferit de gruparea amino). În structura ADN intră două baze purinice, adenina (A) și guanina (G) și două pirimidinice, citozina (C) și timina (T). În structura ARN locul timinei este luat de uracil (U), celelalte baze fiind comune pentru ADN și ARN.

Scanned with OKEN Scanner

Dimensiunile moleculei de ADN la cîteva sisteme biologice *Tabelul 3*

Sistemul biologic	Dimensiunea genomului: Nr. total de perechi de baze (mii)	Dimensiunea genomului: Lungimea totală în mm (mii perechi baze × 3,4 · 10^{4} mm)	Forma moleculei
VIRUSURI			
Polioma, SV40	5,1	0,0017	Circulară, bicatenară.
φ × 174	5,4	0,0018	Circulară monocatenară (forma replicativă dublu-catenară)
M 13 (fd, fl)	6,0	0,0020	Circulară, monocatenară (forma replicativă bicatenară)
P_4	15,0	0,0051	Lineară
T_7	35,4	0,0120	Lineară
P_2, P_{22}	40,5	0,0138	Lineară
λ	46,5	0,0158	Lineară
T_2, T_4, T_6, P_1	144	0,049	Lineară
Vaccina variola	240	0,082	Lineară
BACTERII			
Mycoplasma hominis	760	0,26	Circulară
E.coli	4 000	1,36	Circulară
EUCARIOTE			Nr. cromozomi (set haploid)
Saecharomyces	13 500	4,6	17
Drosophila	165 000	5,6	4
Om	2 900 000	990	23
Peştele dipnoi sud-american *Lepidosiren*	102 000 000	34 700	19

La plante şi animale citozina este înlocuită în proporţii diferite (de la 2% la 6%) de către 5-metil-citozină, în ADN bacterian şi viral întîlnindu-se doar urme ale acestei baze. Un alt derivat al citozinei, 5-hidroxi-metil-citozina — identificat iniţial numai la bacteriofagii seriei T par (T_2, T_4, T_6) — s-a găsit şi la vertebrate, unde înlocuieşte 2—5% din resturile citozină. Uneori uracilul şi 5-hidroxi-metil-uracilul înlocuiesc parţial timina în ADN al bacteriofagilor PBS_1 şi SP_8 de *Bacillus subtilis*. Virusul herpetic prezintă în ADN ribonucleotide covalent legate de dezoxiribonucleotide, iar în ADN al bacteriofagului ΦW—14 se află o bază hipermodificată numită α — — putresciniltimină. Pe de altă parte, în unele categorii de ARN, se află timina.

Scanned with OKEN Scanner

Bazele purinice care intră în mod normal în structura acizilor nucleici naturali sînt A, G, 6-metiladenina și hipoxantina (6-oxipurina). Aceasta din urmă intră în structura acidului inosinic — I (formă intermediară obligatorie în biosinteza de novo a nucleotidelor purinice) și în ARN de transfer.

Bazele pirimidinice care intră în mod normal în structura acizilor nucleici naturali sînt T, C, U, 5-metil-citozina, 5-hidroxi-metil-citozina și 5-hidroxi-metil-uracilul (Davidson, 1972).

Bazele azotate conțin duble legături conjugate, din care cauză ele prezintă stări tautomerice (ceto-enolică pentru G, T și U, respectiv amino-imină pentru A și C). Stările tautomerice cetonică și aminică se găsesc în mod obișnuit în acizii nucleici naturali.

Din unirea unei baze azotate cu un rest de pentoză și cu un rest fosforic rezultă nucleotidul. În concluzie, între nucleotidele ARN (ribonucleotide) și nucleotidele ADN (dezoxiribonucleotide) apar următoarele deosebiri:

a) Restul pentozic este o β—D riboză în ribonucleotide și o β—D—2 dezoxiriboză în dezoxiribonucleotide.

b) Bazele majore A, G, și C sînt comune ribo- și dezoxiribonucleotidelor, exceptînd cea de a patra bază majoră care în ribonucleotide este U iar în dezoxiribonucleotide este T.

Diversitatea ribo- și dezoxiribonucleotidelor este conferită de bazele azotate, nu de resturile pentozice sau restul fosfat. Din această cauză, în descrierile moderne ale structurilor polimerice ale ADN și ARN, secvențele nucleotidice sînt prezentate ca secvențe de baze azotate. Diversitatea secvențelor de baze azotate — substrat molecular al funcțiilor informaționale exercitate în replicare și transcriere — stă la baza diversității speciilor în lumea vie.

2. **Structura primară a ADN.** Structura primară a ADN corespunde configurației monocatenare în care nucleotidele sînt înșiruite într-o ordine caracteristică fiecărei specii, rezultînd o catenă polinucleotidică, formată dintr-o coloană glucidofosforică bazată pe legături (punți) covalente stabile fosfodiesterice de tip 3′—5′ (fig. 5). Repetivitatea legăturilor fosfodiesterice face ca să apară două capete (extremități) ale monocatenei care au fost desemnate prin 3′ și 5′.

Legăturile fosfodiesterice 3′—5′ condiționează formarea de catene lungi, polinucleotidice, neramificate, conferind macromoleculei de ADN posibilitatea de a înscrie sub forma unor secvențe de baze azotate informația genetică de mare diversitate, teoretic nelimitată. S-a constatat că se pot forma și punți fosfodiesterice 2′—5′, dar, spre deosebire de punțile fosfodiesterice 3′—5′, punțile fosfodiesterice 2′—5′ nu pot condiționa formarea de structuri elicoidale (Dhingra și Sarma, 1978). Punțile fosfodiesterice 3′—5′ condiționează formarea unor configurații elicoidale nu numai în ADN, ci și în ARN. Legăturile fosfodiesterice în ansamblu conferă un grad însemnat de flexi-

Scanned with OKEN Scanner

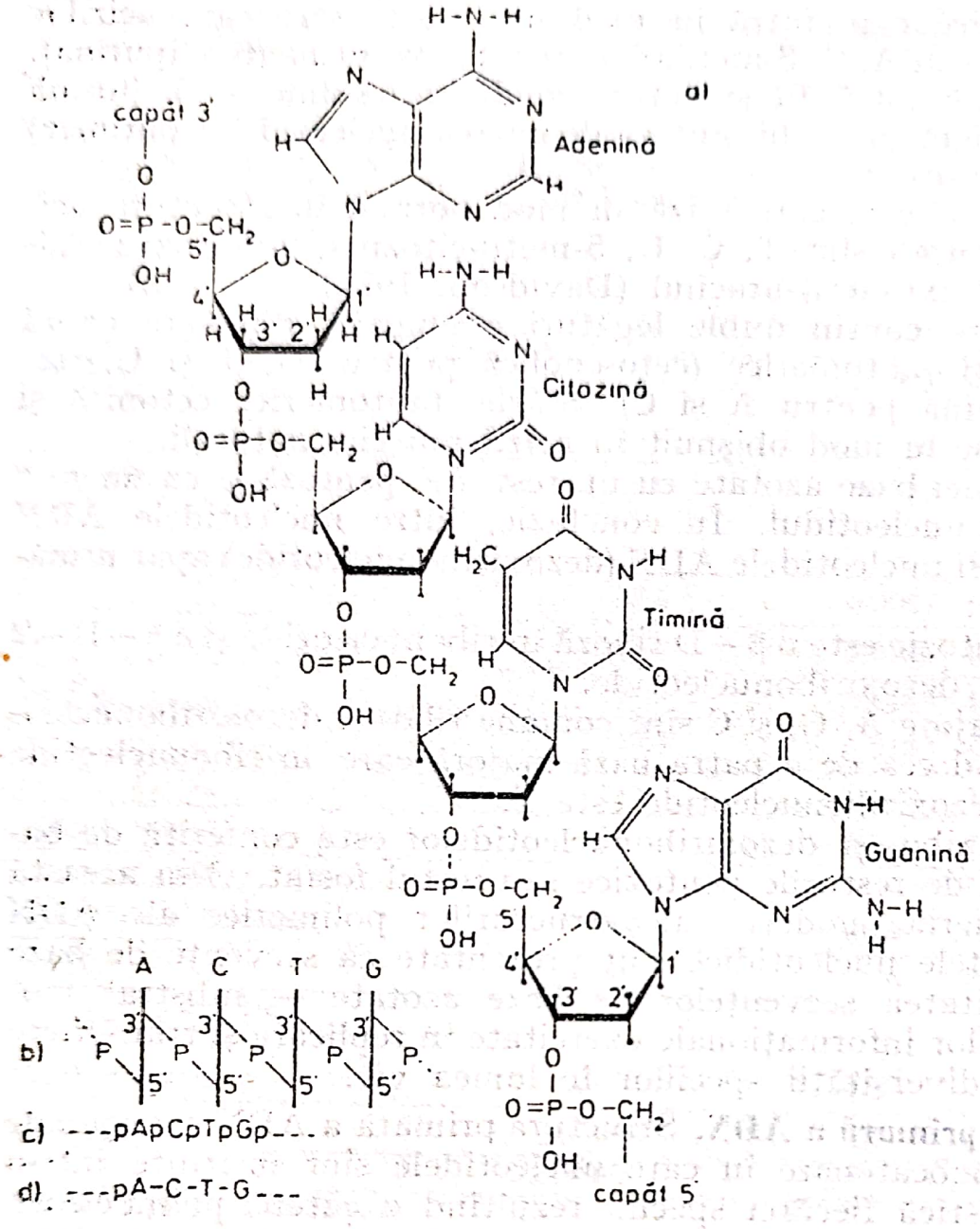


Fig. 5. Structura primară a ADN: *a* = reprezentarea legăturilor fosfodiesterice într-o monocatenă ADN. Se remarcă uniformitatea coloanei fosfoglucidice și diversitatea bazelor azotate, diversitate care conferă specificitatea macromoleculei ADN; *b* = reprezentarea schematică a legăturilor fosfodiesterice 3′—5′; *c* — și *d* — două modalități de a prezenta prin simboluri un segment din monocatena ADN.

bilitate permițînd astfel macromoleculelor de ADN și ARN înfășurări și inflexiuni însemnate cu semnificații structural-funcționale în diferite configurații spațiale ale unor situri specifice, ca și ale suprastructurilor genomice (Neidle, 1978).

3. **Structura secundară a ADN sau structura bicatenară.** Este reprezentată de configurația spațială bicatenară, dublu elicoidală,

Scanned with OKEN Scanner

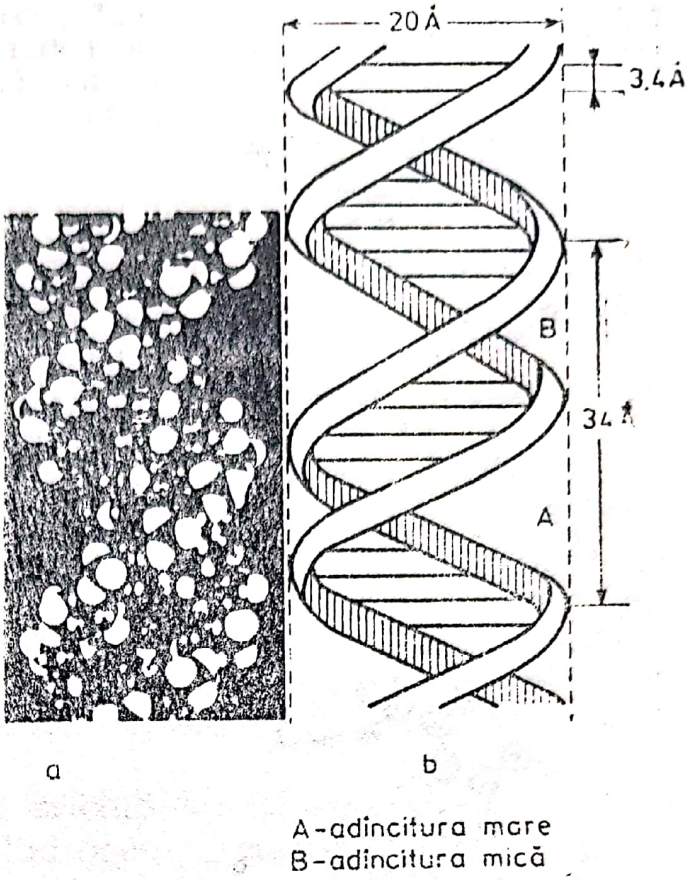


Fig. 6. **Configuraţia elicoidală bicatenară a ADN cu constantele sale fizice:** a = model spaţial; b = reprezentare diagramatică.

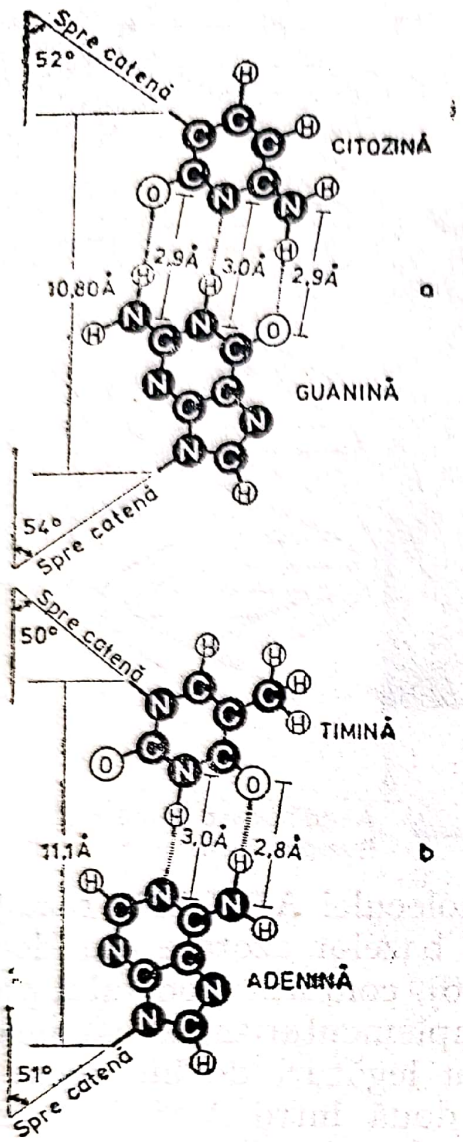
(dublu-helix ADN, duplex ADN) a macromoleculei ADN. Ea rezultă în urma unirii prin legături de hidrogen a bazelor azotate din două catene polinucleotidice complementare (fig. 6), conform modelului propus de Watson şi Crick (1953 a, b). Complementaritatea catenelor se bazează pe împerecherile specifice, prin legături de hidrogen, a bazelor azotate de pe cele două catene, două între A şi T şi trei între G şi C, acestea fiind perechi specifice de baze azotate sau perechi complementare (fig. 7).

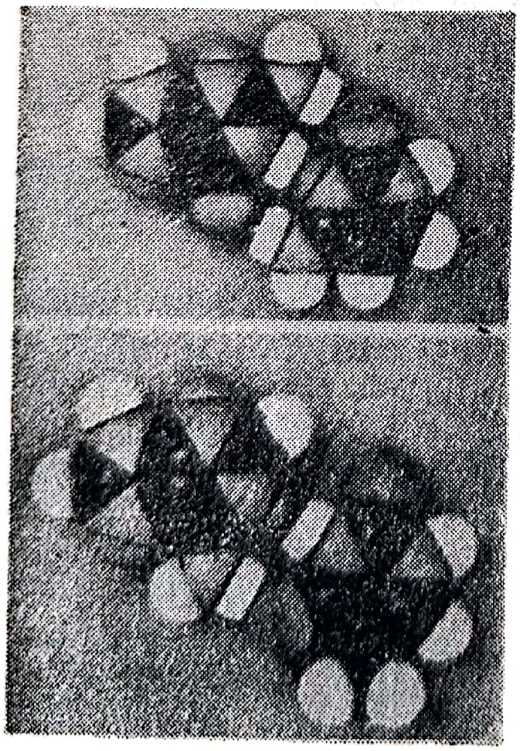
Împerecherea de baze azotate numai în configuraţia A—T, respectiv T—A, şi G—C, respectiv C—G, este condiţionată de:

1) distribuţia grupărilor funcţionale ceto-şi aminice care limitează formarea punţilor de hidrogen numai între o bază cetonică şi alta aminică;

2) dimensiunea bazelor azotate care restricţionează formarea legăturilor de hidrogen numai între o bază purinică de pe o catenă şi o bază pirimidinică de pe cealaltă catenă şi viceversa, perechile purină-purină sau pirimidină-pirimidină fiind imposibile fizic, ele determinînd un diametru mai mare, respectiv mai mic, de 20 Å, cît are structura bicatenară ADN. Aceste reguli de împerechere enunţate de Watson şi Crick (1953) s-au sprijinit pe observaţiile experimentale cantitative ale lui Chargaff (1951) după care A + G = T + C; A + C = G + + T, A = T şi G = C şi pe studiile de difracţie în raze X a soluţiilor de ADN efectuate de Wilkins şi colaboratorii săi (1951, 1953). Restricţiile de împerechere fac ca secvenţa de nucleotide a unei monocatene

Scanned with OKEN Scanner





c

d

Fig. 57. **Perechile de baze C—G (a şi c) şi A—T (b şi d)** într-o reprezentare liniară (a, b) cu constantele fizice corespunzătoare şi într-un model spaţial (c, d).

Scanned with OKEN Scanner

să impună în mod riguros o anumită secvență complementară pe cealaltă catenă în cadrul structurii bicatenare, modul normal sub care se prezintă ADN la marea majoritate a sistemelor biologice. Astfel, o secvență de baze azotate de tipul ... A T C G ... de pe o catenă va corespunde la o secvență complementară ... T A G C .... de pe cealaltă catenă. Perechile de baze sînt dispuse în centrul structurii bicatenare, flancate fiind de coloanele glucido-fosforice. Cele două catene complementare se răsucesc reciproc după un ax virtual în interiorul unui spațiu cilindroid cu diametrul de 20 Å. Distanța dintre două perechi complementare de baze succesive este de 3,4 Å, iar pasul de înfășurare completă a celor două catene este de 34 Å, cuprinzînd circa 10 nucleotide. Înfășurarea celor două catene este de tip plectonemical (fig. 6) cu orientare dextră. Grupele fosfat din ADN sînt hidrofile, conferind substanței un gust acru, acid. Bazele azotate sînt de tip organic avînd caracter hidrofob. Cum ADN se află în mod normal în soluție apoasă, perechile de baze încearcă să se „ascundă" în partea interioară a dublului-helix, resturile glucido-fosforice rămînînd expuse la exterior, datorită și hidrofiliei lor*.

Dublul helix ADN poate fi oricînd supus evenimentelor locale de desfacere a unor punți de hidrogen. Datorită însă persistenței majorității punților de hidrogen, precum și apariției procesului de stivuire *(stacking)* a perechilor de baze, cînd acestea se află încadrate în structura dublu helicoidală (secundară) a ADN, dublul-helix ADN apare ca o structură oarecum rigidă, paracristalină.

Caracteristicile structurale finale ale dublului helix ADN sînt dictate de moleculele de zahăr care se așază cu oxigenul inelului orientat în sus într-o catenă și orientat în jos în catena complementară. Datorită acestui aranjament opus al moleculelor de dezoxiriboză în cele două catene și legării zahărului la o poziție excentrică a bazei azotate atașate, întreaga moleculă de ADN este nevoită să se răsucească spre a forma o dublă spirală (dublu-helix). În cadrul dublu helixului, fiecare pereche succesivă de baze din stivă se întoarce cu 36° în direcția mersului acelor de ceasornic, dublul helix formînd ca urmare un tur complet (360°) la fiecare 10 perechi de baze.

Spațiul dintre coloana vertebrală glucidofosforică a unei catene și cealaltă coloană glucidofosforică nu este uniform umplut de pe-

---

* În anul 1980, A. Rich de la MIT Boston a descris la polimerii sintetici ADN, structuri bicatenare cu orientare senestră. Acest ADN se numește ADN de stînga sau ADN-Z și se admite a exista și la unele tipuri de ADN nativ. Denumirea de ADN-Z provine de la traiectul în zigzag al coloanelor glucido-fosforice. La nivelul său bazele azotate sînt expuse mai spre exterior, ceea ce ar facilita bunăoară interacțiunea cu substanțe carcinogene și transformarea malignă a celulei. De asemenea, ADN-Z ar putea apărea în ADN nativ în cadrul interrelațiilor complexe acizi nucleici — proteine din transcrierea și traducerea genetică, după realizarea proceselor ADN-Z revenind la ADN normal de dreapta.

Scanned with OKEN Scanner

rechile de baze. Un spațiu mai mic din jurul vîrfului unei perechi de baze este umplut comparativ cu cel din jurul bazei, ceea ce creează o zonă goală mai mare și o zonă goală mai mică. În cadrul structurii dublu-helicoidale, zonele mai mari goale se însumează rezultînd scobitura mare, iar zonele mici goale se însumează dînd scobitura mică a dublului helix.

Prin înfășurarea coloanelor glucidofosforice apar în dublul helix ADN aceste două tipuri de adînciturі sau scobituri (engl. — *grooves*) dispuse alternativ pe aceeași parte, o adîncitură mare în care bazele azotate sînt mai bine expuse exteriorului și o adîncitură mică, în care acestea sînt mai puțin expuse. O adîncitură mare de pe o parte a dublului-helix corespunde unei adînciturі mici de pe partea opusă și viceversa. Cele două catene ale dublului helix sînt antiparalele, una fiind ascendentă, alta descendentă, legăturile fosfodiesterice realizîndu-se între C3′ și C5′ pe o catenă și între C5′ și C3′ pe catena complementară (datorită orientării opuse a oxigenului dezoxiribozei pe cele două catene), astfel că fiecare catenă prezintă o extremitate 5′ și o alta 3′, neevidențiindu-se prin studiul fizico-chimic al extremităților monocatenelor capete 5′—5′ sau 3′—3′. Aceasta face ca legăturile fosfodiesterice să fie pe o catenă cu orientarea 3′—5′, iar pe catena complementară 5′ → 3′.

Studii de difracție în raze X au stabilit că ADN se poate găsi în trei forme structurale: *forma A* (distanța dintre perechi de baze este de 2,8 Å, existînd 11 perechi de baze pe spiră); *forma B* (distanța dintre două perechi de baze adiacente este de 3,4 Å fiind 10 perechi de baze pe spiră) și *forma C* (distanța de 3,1 Å și cu o medie de 10,5 baze pe spiră). Forma B este cea tipică pentru structura bicatenară Watson-Crick. În forma A, sub care se află ARN bicatenar și ADN cînd funcționează ca matriță pentru sinteza ARN bazele au o dispoziție oblică față de axul bicatenei. Forma C o capătă macromoleculele ADN în soluții saline concentrate, fiind caracteristică pentru ADN din cromatină și de la unele virusuri.

Lungimea macromoleculei ADN este cu mult mai mare decît diametrul său (20 Å), din care cauză această macromoleculă apare ca o structură filiformă (foto I). Lungimea macromoleculei ADN este apreciată cu ajutorul măsurătorilor efectuate la microscopul electronic, al autoradiografiei și al caracteristicilor vîscoelastice.

Macromoleculele de ADN se află în mod natural sub formă liniară, bicatenară la marea majoritate a organismelor, prezentînd capete libere 3′—5′, respectiv 5′—3′. Dar ele se pot afla și sub formă circulară monocatenară sau bicatenară. Lungimea sa variază de la circa 0,0017 mm, corespunzînd la 5100 nucleotide la virusul SV40, la circa 34700 mm, corespunzînd la 102×10^2 perechi de nucleotide la peștele dipnoi sud-american *Lepidosiren* (tabelul nr. 3). Astfel, macromolecula bicatenară de ADN este cel mai mare polimer existent

Scanned with OKEN Scanner

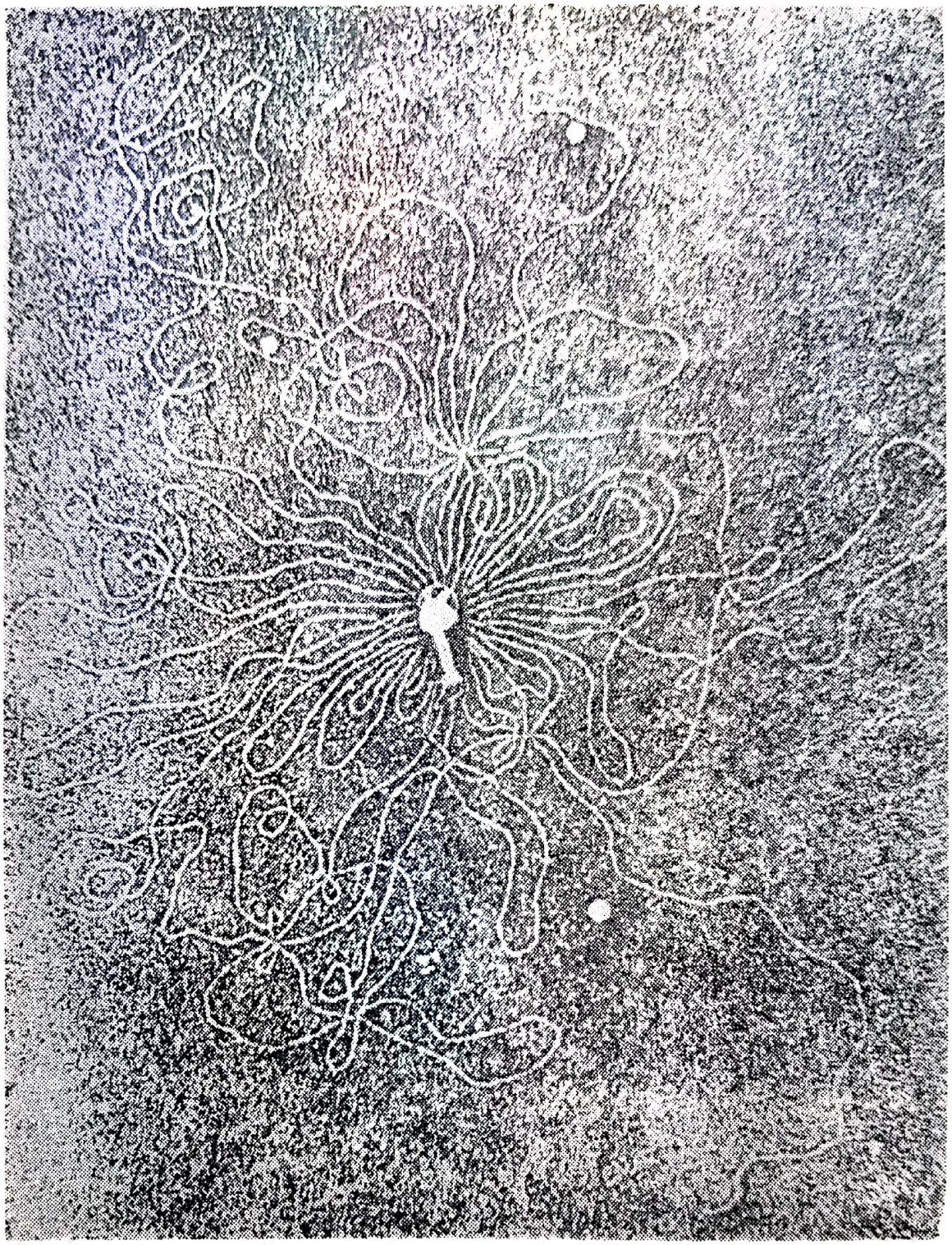


Foto I — ADN bicatenar al fagului T_2, eliberat din capsidă prin şoc osmotic, prezentînd două capete libere (după Kleinschmidt, 1962).

în sistemele biologice.

4. Structura terţiară a ADN. Este reprezentată de configuraţia sa tridimensională care nu poate fi realizată de bicatene cu capete libere, deoarece acestea se pot desfăşura liber în spaţiu. În cazul moleculelor circulare însă, desfăşurarea spaţială a dublului-helix este îngrădită de forţele de contorsiune din care cauză asemenea molecule adoptă configuraţii tridimensionale caracteristice, cunoscute sub denumirea de structuri terţiare.

Scanned with OKEN Scanner

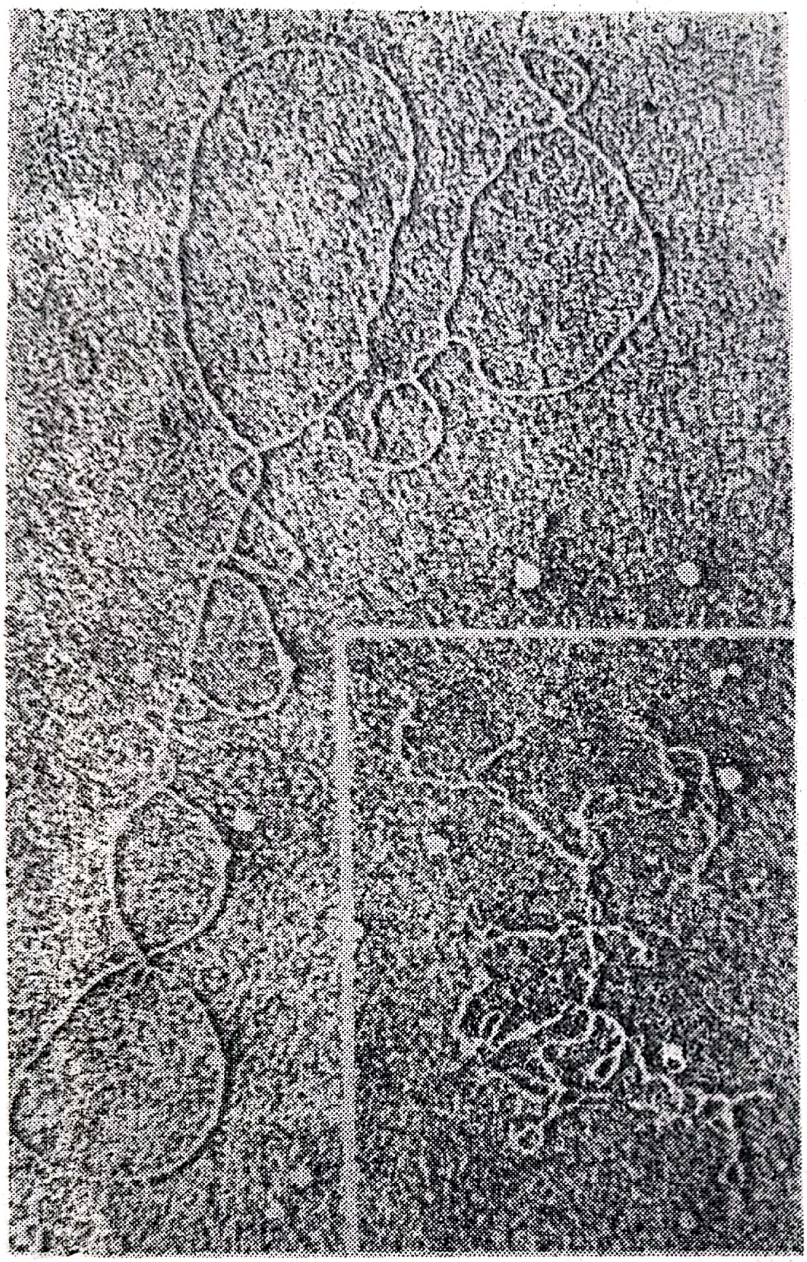


Foto II — **ADN al fagului lambda,** superspiralizat şi covalent închis (după Bode şi MacHattie, 1968).

Macromoleculele circulare ale ADN unor virusuri, mitocondriilor, cloroplastelor şi plasmidelor bacteriene prezintă superspiralizări cunoscute ca supraelice. Acestea apar prin înfăşurarea ADN circular închis şi se numesc torsade (foto II). La ADN de Polioma, vaccina, SV40 şi mitocondrii apar 7, 8 asemenea torsade pe un micron de lungime a moleculei. Prin imbricarea a 2—6 molecule circulare, unite în maniera cercurilor olimpice, rezultă structuri catenane (fig. 8). Asemenea molecule dimerice sau trimerice catenanice au fost descrise în mitocondrii şi la virusul SV40. Structurile circulare pot fi circular covalent închise sau circular deschise (prezintă o tăietură, monocatenară, cealaltă catenă fiind covalent închisă).

Scanned with OKEN Scanner

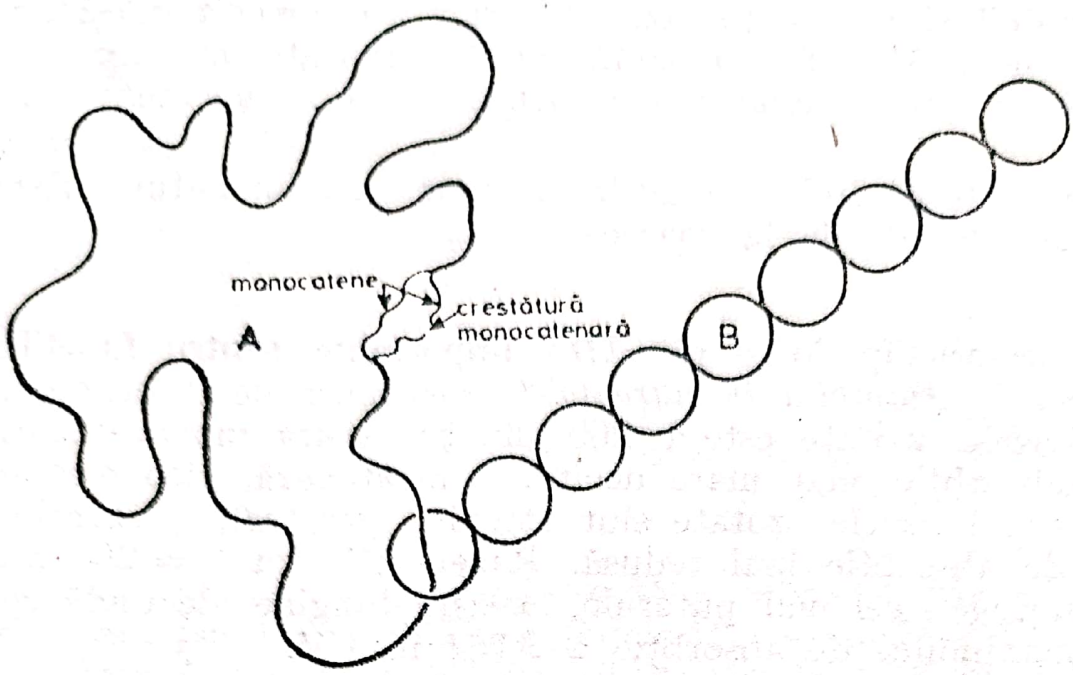


Fig. 8. O moleculă dimeră catenană tipică de ADN, alcătuită dintr-o moleculă circular deschisă (A) şi o moleculă circular covalent închisă (B) (după Davidson, 1972).

Torsadele sînt pozitive sau negative (în afara sau înăuntrul cercului — foto II) şi sînt înlăturate cu ajutorul unei enzime relaxatoare a supraelicelor din ADN numite enzime de tăiere-închidere (*nicking-closing*) care au acţiune opusă ADN-girazei, enzimă care poate introduce în dublul helix ADN asemenea torsade (Laskey şi colab., 1978).

5. **ADN monocatenar nativ.** În mod natural, ADN se află sub formă dublu-elicoidală, bicatenară. În laborator structurile bicatenare de ADN pot fi separate în monocatene prin denaturare termică. Dar cercetările clasice ale lui Sinsheimer (1959) au arătat că la fagul $\Phi \times 174$, ADN se prezintă în stare naturală ca macromoleculă monocatenară. ADN de $\Phi \times 174$ este în mod specific dezintegrat de către fosfodiesteraza de *E. coli*, enzimă care, de regulă, nu atacă ADN bicatenar. Prin tratarea termică a preparatului ADN de $\Phi \times 174$ nu are loc trecerea acestuia în stare caracteristică de ghem, exprimîndu-se astfel existenţa unei structuri diferite de cea bicatenară. Totodată, corespondenţa molară a bazelor din acest ADN nu se încadrează în echivalenţa A = T şi G = C, caracteristică oricărei structuri bicatenare. ADN monocatenar de $\Phi \times 174$ este circular închis, fapt dovedit şi de ineficacitatea exonucleazei I de *Escherichia coli*, ca şi a exonucleazei pancreatice, active numai pe macromolecule liniare de ADN care prezintă capete libere 3′—OH. Sub acţiunea DN-azei, pancreatice, ADN de $\Phi \times 174$ trece din formă circulară în formă liniară

devenind sensibil și la exonuclează. Ulterior s-a dovedit că și alți fagi, precum ΦR, S13, Fd, prezintă ADN monocatenar. Recent a fost izolat și un virus animal care prezintă ADN monocatenar circular.

ADN monocatenar liniar se întîlnește foarte rar în natură. Este cazul virusului *minute* de la șoarece.

6. Unele proprietăți fizice ale ADN importante pentru funcțiile sale biologice. 1. *Absorbția în ultraviolet.* Maximum de absorbție în UV pentru bazele azotate este de 260 nm. Structura monocatenară prezintă o absorbție mai mare decît cea bicatenară, deoarece în aceasta din urmă bazele azotate sînt stivuite (*stacked*), prezentînd o suprafață de absorbție mai redusă. Razele UV cu $\lambda = 260$ nm au efectul mutagen cel mai puternic, această lungime de undă corespunzînd maximului de absorbție a ADN în UV.

2. *Denaturarea și renaturarea ADN.* În anumite condiții naturale (în replicare și transcriere) sau experimentale (tratări termice și cu acizi, baze, *p*H foarte înalt sau foarte scăzut) are loc trecerea (denaturarea) de la structura bicatenară la structura monocatenară, însoțită de o creștere marcată (cu 40%) a densității optice în zona maximului de absorbție. Acesta este efectul hipercromic care este însoțit de o diminuare a viscozității. Denaturarea presupune ruperea legăturilor de hidrogen dintre catenele complementare. Ea se realizează prin ridicarea temperaturii de la 70° la 90°C. O ridicare în continuare a temperaturii duce la degradarea macromoleculei ADN prin ruperea legăturilor covalente mai întîi dintre purine și scheletul glucido-fosforic și apoi dintre pirimidine și acest schelet. Momentul în care are loc desfacerea structurii bicatenare în monocatene (denaturarea) se poate stabili spectrofotometric (fig.9), constatîndu-se o creștere abruptă a densității optice (efect hipercromic) datorat expunerii bruște la nivelul monocatenelor a bazelor azotate care reprezintă grupe cromofore. Denaturarea a fost numită „topirea" *(melting)* ADN și ea se realizează la o anumită temperatură numită temperatură de topire (Tm). Punctul de topire reprezintă temperatura la care a avut loc disocierea a 50% din moleculele bicatenare în monocatenare. El este dependent de compoziția în nucleotide a ADN, perechile G—C între care există trei punți de hidrogen fiind mai rezistente la denaturare față de perechile A—T între care există doar două punți de hidrogen. Denaturarea deci începe la nivelul regiunilor bogate în A—T. Valoarea Tm poate da indicații asupra compoziției în baze a ADN, ea fiind mai mare la un ADN bogat în GC și mai mică la un ADN bogat în AT (fig. 10). Cum fiecare specie are un raport caracteristic GC/AT, tot astfel există pentru fiecare specie o anumită valoare a Tm.

Scanned with OKEN Scanner

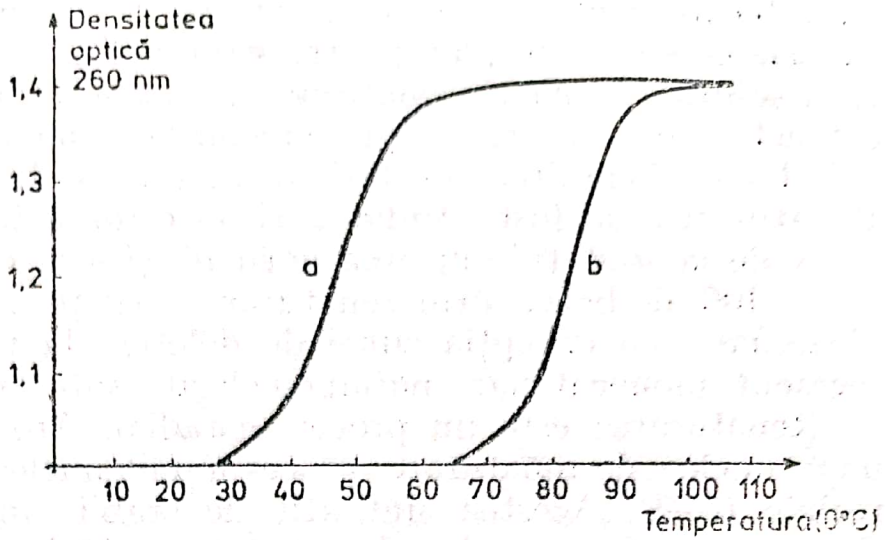


Fig. 9. **Evidenţierea prin efectul hipercromic a denaturării ADN:** a = în mediu cu concentraţie ionică slabă; b = în mediu cu concentraţie ionică ridicată.

Denaturarea poate fi reversibilă (renaturare) sau ireversibilă (denaturare permanentă). Dacă după denaturare termică are loc o răcire bruscă a soluţiei, atunci nu mai poate avea loc reasocierea catenelor cu refacerea structurii dublu-catenare (denaturare ireversibilă). Dacă soluţia este răcită foarte lent (călire), catenele se reasociază pe baza complementarităţii şi se reface structura bicatenară avînd loc renaturarea ADN (Marmur şi Doty, 1961). După denaturare-renaturare, ADN bacterian îşi păstrează proprietăţile biologice. Fenomenul denaturării-renaturării este folosit în cadrul experienţelor de hibridare moleculară ADN—ADN şi ADN—ARN. Hibrizii moleculari ADN—ARN sînt uşor separaţi prin ultracentrifugare în gradient de densitate, avînd o densitate intermediară între ADN şi ARN.

Renaturarea este dovedită spectrofotometric prin efectul hipocromic (reducerea cu 40% a absorbţiei în UV rezultată în urma mascării parţiale a bazelor azotate, care sînt cromofore, în cadrul struc-

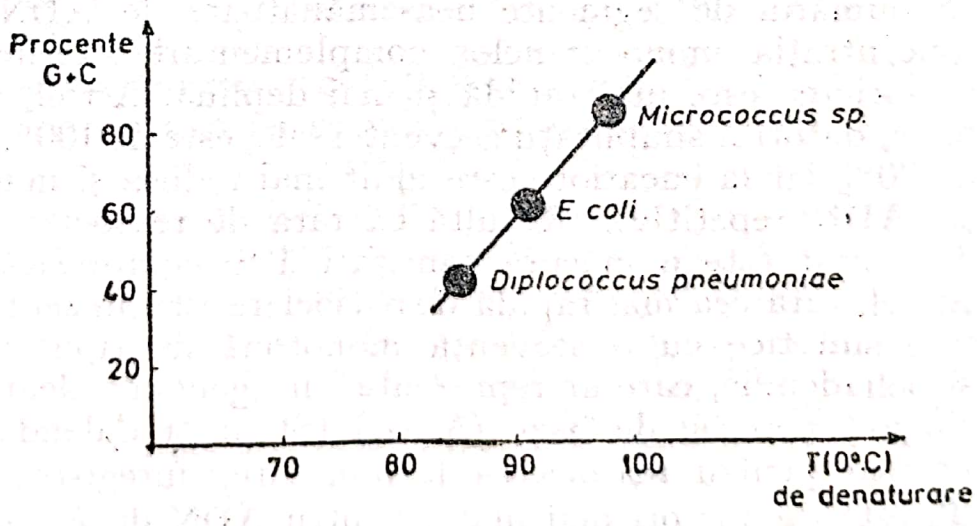


Fig. 10. **Influenţa compoziţiei procentuale în G+C asupra temperaturii de denaturare la bacterii.**

Scanned with OKEN Scanner

turii bicatenare), modificarea vitezei de sedimentare și inaccesibilitatea nucleazelor specifice pentru structuri monocatenare. Răcirea bruscă a soluției de ADN denaturat face să se reducă mobilitatea monocatenelor, reduce frecvența „ciocnirilor" moleculare dintre acestea, avînd loc ghemuirea lor fără o reasociere în structuri bicatenare. Renaturarea a fost studiată și electronomicroscopic, folosindu-se ADN de la două tulpini, una normală și alta care a suferit deleții de peste 100 de baze. Prin renaturare apar pe electronografii structuri bicatenare, cu excepția zonei de deleție la nivelul căreia apare un segment monocatenar, neîmperecheat, sub forma unei bucle.

Renaturarea este un proces bistadial. Are loc mai întîi formarea unor nuclee de renaturare, proces numit nucleație, și care implică perechile G—C. Acestea sînt atît de stabile încît o singură pereche G—C poate fi un nucleu de renaturare (Malcom, 1975). Apoi are loc o rapidă reasociere, comparabilă cu închiderea unui fermoar, cu formarea unor structuri bicatenare uniforme. Desfășurîndu-se cu o cinetică specifică reacțiilor de ordinul 2, renaturarea depinde de mai mulți factori, esențiale fiind concentrația de catene complementare și durata contactului dintre ele. Eficiența ratei de renaturare este apreciată cu ajutorul valorii *Cot*, valoare care în același timp permite definirea organizării genomice. Valorile Cot sînt definite prin formula $Co \times t$, în care Co este concentrația inițială de ADN exprimată în moli de fosfor ADN sau moli de nucleotide la litru și t este timpul de incubație, în condiții standard, dat în secunde. Valoarea Cot se extrapolează la valorile de absorbție în UV care indică eventualul efect hipocromic, exprimîndu-se pe o scară logaritmică, variind de la 10^{-4} la 10^{4} ($Å_{260}$ unități/ml $\times$ h/2 = Cot). Cot 1/2 reprezintă 50% din procentul de renaturare. Unitatea Cot este dată în moli/s sau unități de absorbție citite la 260 Å/oră $\times$ 0,5. ADN care renaturează la valori Cot scăzute ($10^{-4} - 10^{-1}$) este compus din secvențe înalt repetate iar între 10^{1} și 10^{2} — ADN moderat repetitiv. Valorile Cot înalte caracterizează ADN foarte puțin repetitiv sau nerepetitiv. Cu cît numărul de segmente neasemănătoare de ADN este mai mic și concentrația monocatenelor complementare este mai mare, cu atît reasocierea este mai rapidă și mai deplină. Astfel, renaturarea ADN fagic, datorită simplității secvenței sale, este de 100%, a celui bacterian de 70% iar la eucariote este mult mai redusă și mai lentă (cu excepția ADN repetitiv). Rezultă că rata de reasociere a catenelor ADN denaturat este o măsură cantitativă a complexității secvenței lor. Astfel, rata cea mai rapidă de reasociere este prezentată de polinucleotide sintetice cu o secvență monotonă de tipul acizilor poliuridilic și poliadenilic, care ar reprezenta un „genom" alcătuit numai dintr-o singură pereche de baze (A—U) (Stent și Calendar, 1978). Timpul necesar pentru reasocierea la jumătate, înregistrat la ADN de fag T_4 este de 10^{5} ori mai mare, pentru ADN de *E. coli* de 5×10^{8} ori

Scanned with OKEN Scanner

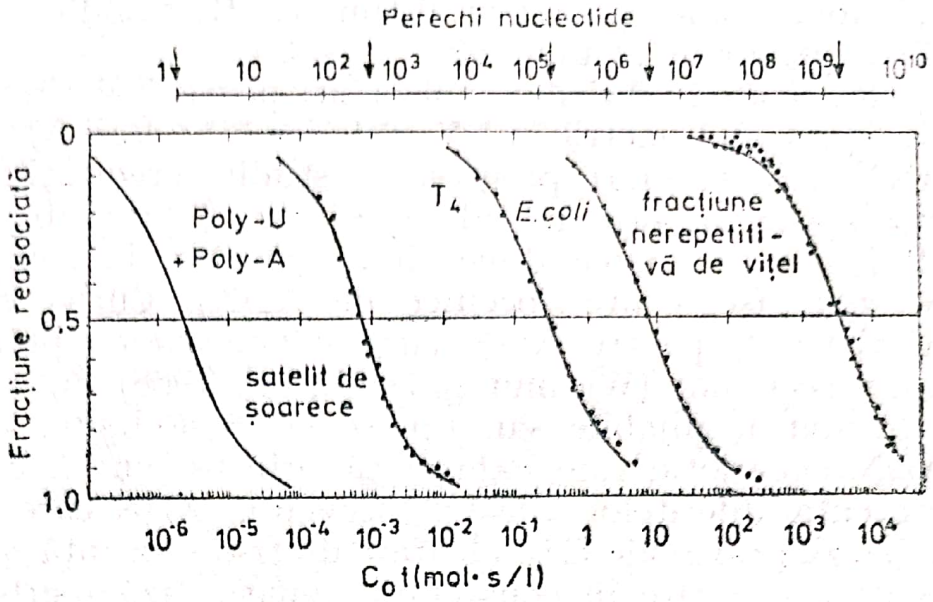


Fig. 11. Cinetica reasocierii ADN dublu-catenar disociat ce provine de la diferite organisme. Dimensiunea genomului în termeni de perechi de baze pentru fiecare sursă de ADN este indicată prin săgeţile de pe scala logaritmică aflată în partea de sus a figurii. Probele de ADN au fost fragmentate prin agitare mecanică pînă la fragmente de circa 400 nucleotide şi incubate la o temperatură în jur de 60°C, stabilită a fi optimă pentru reasocierea acestor monocatene în dublu-helixuri. Periodic a fost măsurată absorbţia UV de către aceste soluţii de ADN la 260 nm, în vederea urmăririi procesului de reasociere a catenelor cu ajutorul descreşterii cu 40% în absorbţie UV care însoţeşte reformarea structurilor dublu-elicoidale. „Fracţiunea reasociată", redată pe ordonată, este estimată din absorbţia UV notată cu A ca $(A_d - A)(A_d - A_i)$, unde A_d şi A_i sînt absorbţiile UV ale probelor de ADN complet denaturat (A_d) şi complet intact dublu-catenar (A_i). Abscisa redă „timpul normalizat" (Cot, care este produsul dintre concentraţia iniţială (în moli de nucleotide la litru) al probei de ADN denaturat, aflat în amestecul de reacţie, şi numărul de secunde care au trecut din momentul în care soluţia a fost încălzită pînă la temperatura de reasociere, redat la scară logaritmică. Se poate constata că timpul Cot, necesar pentru a se realiza jumătate din procesul de reasociere, este proporţional cu numărul de perechi de baze nucleotidice din genomul din care a fost extras ADN (după R. Britten, „Science", 161, 529, 1968)

mai mare, iar pentru ADN din timus de viţel de 10^9 ori mai mare. decît cel necesar pentru reasocierea acizilor poliuridilic şi poliadenilic (Britten, 1968) (fig. 11).

La eucariote eterogenitatea secvenţială a diferitelor molecule de ADN este mare. Valorile Cot au specificitate de specie. Prin tehnica denaturării-renaturării se realizează hibrizi moleculari între diferite specii (Marmur şi colab., 1963), stabilindu-se legăturile lor filogenetice, renaturarea fiind cu atît mai eficientă şi mai rapidă cu cît speciile analizate prezintă secvenţe de nucleotide omoloage mai lungi, deci un grad mai mare de similitudine a informaţiei genetice şi sînt în consecinţă mai înrudite filogenetic (Schildkraut, 1961). Pentru hibridare moleculară se procedează la marcarea ADN unei specii cu izotopi grei (^{15}N cel mai des folosit) sau radioactivi (^{32}P) şi tritiu (^3H). În cazul hibridărilor *in situ* în care se urmăreşte localizarea genelor ribozomale pe cromozom se marchează ARN. Tritiul este încorporat

Scanned with OKEN Scanner

sub forma unui precursor al timinei, ^{3}H-timidina, în ADN și ^{3}H-uridina, precursor al uracilului în ARN.

Realizarea hibrizilor moleculari poate fi verificată autoradiografic sau spectrofotometric în UV. Tehnica hibridării ADN—ADN și ADN—ARN a adus mari progrese în studiul eredității, în localizarea precisă a genelor prin hibridare *in situ* (John și colab., 1969; Kennell, 1971), în aprecierea dimensiunii genelor, în sinteza și manipularea de gene (segmente specifice de ADN). Curba cineticii renaturării (Curba Cot) pentru ADN viral și bacterian reprezintă o cinetică de ordin secundar (Wetmur și Davidson, 1968), în care secvențele repetate sînt neglijabile sau lipsesc cu desăvîrșire. Cinetica renaturării ADN eucariotic este exprimată printr-o curbă complexă care redă prezența diferitelor clase de secvențe. ADN care bandează ca satelit al benzii principale este alcătuit dintr-o secvență simplă dar repetată de 10^7 ori, și care, în consecință, renaturează foarte rapid. Partea cea mai mare a moleculei ADN prezintă însă secvențe unice, în acest caz renaturarea fiind înceată. Cinetica renaturării reflectă complexitatea genomului (Britten și Kohne, 1966, 1968), existînd o relație invers proporțională între mărimea genomului și rata de reasociere, dar la eucariote numai o parte din ADN genomic se supune acestei reguli. Astfel, la șoarece circa 10% din ADN prezintă o rată de reasociere mai mare chiar decît ADN viral. El corespunde la ADN satelit, care are o secvență simplă, dar înalt repetată. În acest caz șansa de a se întîlni catene complementare este mult mai mare decît pentru restul de ADN care prezintă secvențe în copii unice. La acesta din urmă, șansa de a se întîlni catene complementare este mai mică și ca urmare și rata reasocierii este mică.

3. *Ultracentrifugarea izopicnică* și densitatea de plutire* (ρ). Introducerea ultracentrifugării a adus rezultate deosebite în caracterizarea moleculelor ADN. În soluția de clorură de cesiu (CsCl) centrifugată un timp îndelungat la valori centrifugale mari se formează un gradient de densitate cu valori descrescînde de la partea de sus a tubului centrifugal spre fundul acestuia. Dacă în acest gradient vor fi centrifugate moleculele de ADN, acestea vor sedimenta la nivelul la care valoarea densității gradientului este egală cu valoarea densității ADN (ultracentrifugare izopicnică sau analitică). Se realizează astfel un echilibru de densitate între gradientul CsCl și ADN, moleculele ADN condensîndu-se sub forma unei benzi nemigratoare, ce plutește în tubul de centrifugă la acel nivel dat (Meselson și colab., 1957). Valoarea densității ADN în acest caz se numește densitate de plutire *(buoyant density)* și se notează cu ρ. Valorile densității de plutire prezintă mari semnificații. Ele pot reflecta starea fizică a macromoleculei ADN (dublu-catenară sau mono-

* *isos* = același; *picnos* = condensare.

Scanned with OKEN Scanner

catenară), raportul GC/AT, lungimea lor etc. Structurile monocatenare au ρ mai mic față de cele dublu-catenare, astfel că un amestec al unor asemenea tipuri de molecule dă — prin ultracentrifugare izopicnică — două benzi diferite. De asemenea, un ADN bogat în GC are o valoare ρ mai mare față de aceea a unui ADN bogat în AT. La unele virusuri una dintre cele două catene ale ADN prezintă secvențe lungi de purine, pe cînd cealaltă catenă prezintă secvențe lungi de pirimidine, încît după denaturare, prin ultracentrifugare izopicnică, se separă o catenă grea (H) și o catenă ușoară (L) la nivelul a două benzi diferite. Benzile individuale pot fi colectate separat prin decantare fracționată în condiții speciale de contenție a tubului centrifugal și se efectuează fie prin pipetare, fie prin înțeparea fundului tubului de centrifugă cu un ac canulat. ADN uman ultracentrifugat izopicnic prezintă patru benzi separate, una fiind banda principală, celelalte fiind benzi satelitice care de regulă reprezintă ADN cu secvențe repetate. ADN marcat cu izotopi grei ai carbonului (^{14}C) — acesta este și radioactiv — sau azotului (^{15}N) prezintă o valoare ρ mai mare decît cel nemarcat (^{12}C, respectiv ^{14}N), separîndu-se ușor de acesta din urmă. ADN al procariotelor dă prin ultracentrifugare izopicnică o singură bandă simetrică. ADN total extras din *Saccharomyces cerevisiae*, supus ultracentrifugării izopicnice (24 ore la 45 000 turații/min), dă trei benzi distincte asimetrice, diferite prin conținutul lor în GC, dintre care una este principală, $\rho = 1{,}698$ g/cm³, și două sînt satelitice, $\rho = 1{,}680$ și respectiv 1,731 g/cm³. Banda principală poate reprezenta ADN nuclear, pe cînd benzile satelitice pot reprezenta o fracțiune a acestuia (ADN repetitiv) sau ADN al organitelor. Densitatea de plutire (ρ) a moleculelor de ADN în CsCl crește paralel cu creșterea conținutului de G + C, ceea ce poate fi desprins din următoarea relație:

$$\rho = 1{,}660 + 0{,}00098\ (G + C),$$

cu ajutorul căreia poate fi stabilită compoziția în baze nucleotidice a unei probe date de ADN, nu printr-o analiză chimică laborioasă, ci doar prin determinarea densității de plutire în gradient de CsCl. Avantajul acestei căi fizice de determinare a compoziției în baze azotate a ADN este mai mare prin faptul că pot fi analizate probe foarte mici de ADN care nici nu trebuie să îndeplinească dificila condiție de a fi foarte pure chimic, așa cum pretinde metoda chimică directă. Pe această cale s-a putut stabili compoziția procentuală în G + C la o serie de microorganisme comparativ cu polimerul A—T care are $\rho = 1{,}679$ g/cm³ și evident un procent de 0% G + C. Astfel s-a stabilit că la *Streptococcus pneumoniae* $\rho = 1{,}700$ g/cm³ și un conținut G + C de 42%; *E. coli* are $\rho = 1{,}710$ și 51% moli G + C; *Serratia marcescens* are $\rho = 1{,}718$ și 59% moli G + C, iar *Mycobacterium phlei* are $\rho = 1{,}732$ și 73% moli G + C (L.C. Schildkraut, J. Marmur, P. Doty, 1962).

Scanned with OKEN Scanner

7. **Analiza secvenței de nucleotide din ADN.** Componența nucleotidică a ADN se exprimă cel mai adesea prin conținutul G + C, care este variabil în limite mari la bacterii (0,3 — 0,7) și mai uniform la eucariote (0,5).

În ultimul deceniu au fost puse la punct tehnici de secvențiere foarte sofisticate care au permis descifrarea secvenței totale sau parțiale a ADN și ARN la numeroase virusuri și gene de la eucariote. Astfel, s-a determinat secvența ADN la fagul $\Phi \times 174$ care conține 5 375 nucleotide grupate în 9 segmente, fiecare reprezentînd cîte o genă (Grobstein, 1977). S-a realizat, de asemenea, secvențierea ADN la SV40. Secvențierea ADN bacterian și eucariot este însă mult mai dificilă, dată fiind dimensiunea mult mai mare a genomului lor comparativ cu cel viral. În tehnicile de secvențiere folosirea enzimelor, exo- și endonucleaze, mai ales a endonucleazelor de restricție, reprezintă un mijloc curent de fragmentare a macromoleculei ADN în vederea obținerii de fragmente care apoi sînt supuse secvențierii, utilizîndu-se electroforeza bidimensională după metoda Sanger prin care se obțin „fingerprinturi" caracteristice.

Există două posibilități de secvențiere:

Metoda indirectă prin analiza secvenței de bază a moleculelor de ARN transcrise *in vitro* pe ADN extras de la fagii transductanți ce poartă sectoare relevante ale cromozomului bacterian. Aceasta este însă o metodă foarte laborioasă și cere mult timp.

Metoda directă a fost propusă de Maxam și Gilbert (1977) și presupune obținerea unui set de fragmente specifice de ADN, de circa 100 nucleotide lungime, prin digestie cu endonuclează de restricție a moleculei bicatenare de ADN ce trebuie analizată. Grupul fosfat de la capătul 5′ al catenelor ADN ale tuturor acestor fragmente este înlocuit cu un grup fosfat marcat radioactiv cu ^{32}P prin acțiunea unei polinucleotid-kinaze. Catenele ADN marcate ^{32}P sînt apoi fracționate cromatografic, corespunzător dimensiunii și compoziției lor în baze azotate, astfel că se poate stabili secvența de baze azotate a acestor catene. Pentru clivarea fragmentelor se folosesc diferite tratamente. Astfel, cu dimetilsulfat se determină metilarea purinei, iar prin acțiunea HCl la rece și a NaOH la cald sînt clivate resturile acidului adenilic (A). Pe aceeași cale, dar prin încălzire în piperidină, are loc clivarea specifică la siturile guanilice (G). Sub acțiunea hidrazidei se deschide inelul pirimidinic, iar prin încălzire în piperidină are loc clivarea specifică la siturile T și C. Tratamentul cu hidrazidă + 2M NaCl deschide inelul citozinei și prin tratamentul la cald cu piperidină are loc clivarea siturilor C.

Se obține o serie de catene polinucleotidice, variind în lungime de la 1 la circa 100 nucleotide, care sînt supuse gel-electroforezei. Catenele polinucleotidice migrează în cîmpul electric cu o viteză invers proporțională lungimii lor. Apare o serie de benzi în gel. Banda cea mai

Scanned with OKEN Scanner

îndepărtată de punctul de start este o mononucleotidă, următoarea de sub ea este o dinucleotidă, următoarea o trinucleotidă etc., cea de a o suta bandă din gel fiind o catenă polinucleotidică de 100 nucleotide. Localizarea benzilor în gel este detectată autoradiografic căci atomii ^{32}P emit radiații. Fiecare bandă marcată ^{32}P, generată printr-un tratament specific dat, relevă prezența la un sit din fragmentul ADN a bazei care este în mod specific clivată prin tratamentul aplicat. Ordinea benzilor indică ordinea siturilor ocupate de acea bază, începînd de la capătul 5′ al fragmentului. Secvența de baze a fragmentului ADN poate fi astfel citită direct din cele patru modele de benzi generate de cele patru tratamente specifice.

Pe această cale a fost secvențiat locusul trp O^+ de la tipul sălbatic de *E. coli* ca și tipul mutant trp O^c (foto III). Secvența la nivelul celor două situri diferă prin aceea că la tipul normal într-un sit dat se află o adenină pe cînd la tipul mutant se află citozina. Se demonstrează astfel că la *E. coli* mutantul trp O^c, care este de tip operator constitutiv (vezi reglajul genetic), ca și mutantul lac O^c, apar în urma unei mutații de transversie (vezi mutageneza).

Alte metode de secvențiere folosite în decursul anilor au fost: metoda blocurilor de pirimidine din ADN, metoda proximei vecinătăți, iar mai recent metoda plus și minus (fig. 12). Pe baza metodei proximei vecinătăți, Josse și colab. (1961) au dovedit experimental antiparalelismul catenelor complementare ale structurii bicatenare a ADN, respectiv sensul opus 3′→5′ și 5′→3′ al legăturilor fosfodiesterice pe cele două catene complementare. Marcajul radioactiv în secvențiere a ușurat foarte mult această dificilă operație (Maxam și Gilbert, 1977). Prin stabilirea secvenței a 12 nucleotide de la extremitățile adezive ale ADN al fagului λ s-a explicat baza circularizării sale (Wu și Taylor, 1971), existînd la aceste extremități adezive secvențe complementare lungi de 12 nucleotide:

—3′—G—G—G—G—C—C—G—C—T—G—G—A $OH^{-5'}$

G—G—G—C—G—G—C—G—A—C—C—T—3′—

Prin secvențierea parțială și uneori totală a acizilor nucleici (ADN și ARN) s-au obținut date de mare importanță privind structura în baze azotate a unor gene, stabilirea siturilor de interacțiune a macromoleculelor de ADN cu enzimele polimerazice angajate în replicare și transcriere, structura ARNm și a siturilor de traducere etc.

Prin secvențiere s-a stabilit că ADN al procariotelor se caracterizează prin existența unor secvențe unice de nucleotide, pe cînd ADN eucariotic prezintă mai multe categorii de secvențe: unice, mijlociu repetate și înalt repetate. Astfel, la șoarece, într-o catenă apare repetată secvența C—C—C—T—A—A, iar în catena complementară secvența G—G—G—A—T—T—. La unele specii de crab apare repetat copolimerul A—T. La *Drosophila melanogaster* trei secvențe heteronucleo-

Scanned with OKEN Scanner

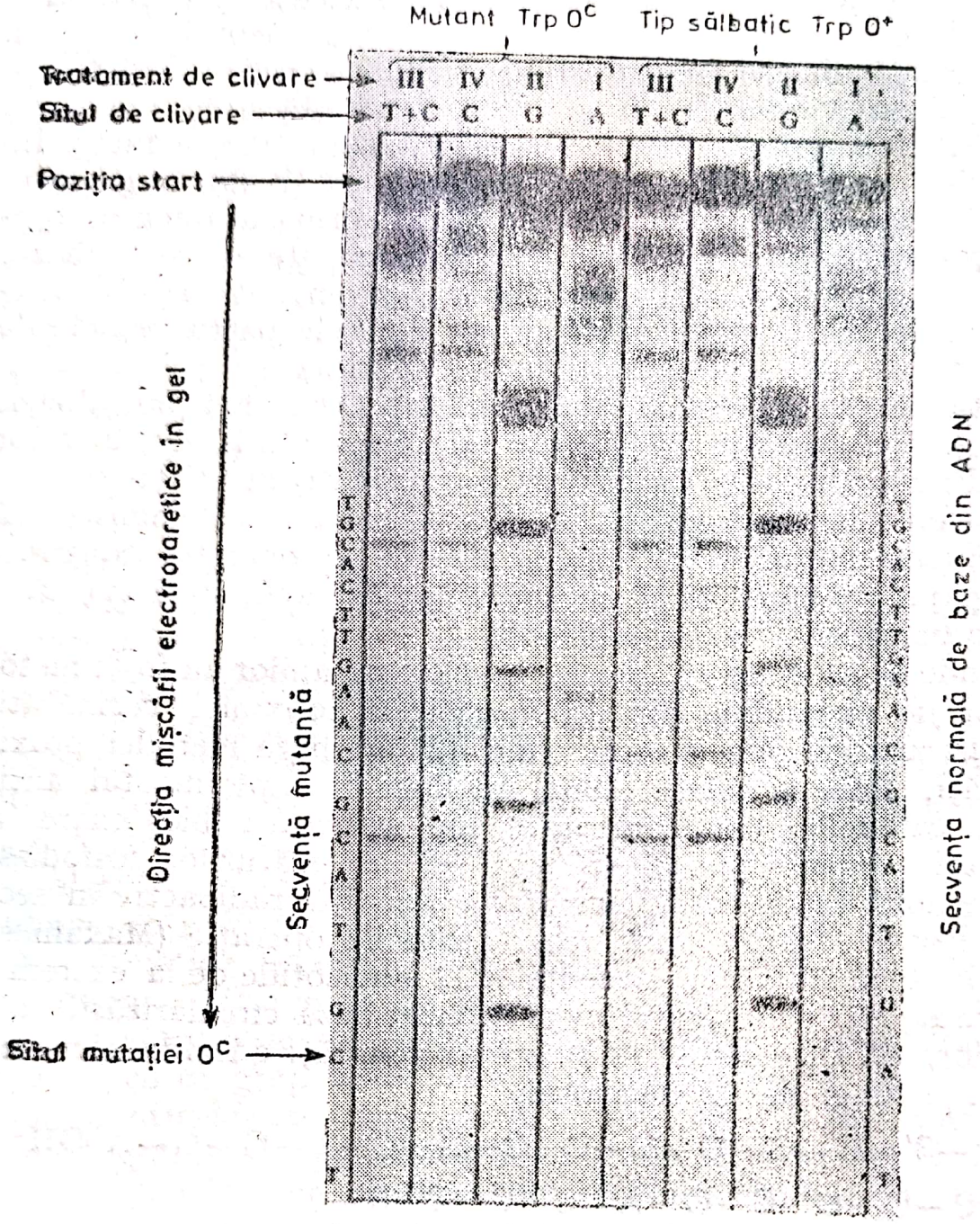


Foto III — **Metoda lui Maxam și Gilbert, de secvențiere directă a ADN,** prin care s-a stabilit secvența de baze nucleotidice din locusul trp O^+ (operatorul operonului triptofan) la tipul normal de *E.coli* și la unul dintre mutanții săi de tip operator constitutivi (trp O^c). Imaginea reprezintă autografia unui gel după electroforeza a opt probe ale unor fragmente de ADN de *E.coli*, marcate cu ^{32}P și rezultate în urma acțiunii endonucleazei de restricție. Secvențele de baze azotate deduse din aceste modele electroforetice sînt indicate cu simbolurile corespunzătoare pe cele două laturi ale autoradiogramei (după Bennett și Yanofsky, din Stent și Calendar, 1978).

tidice se repetă de 10^7 ori. Ele sînt: 5′ — ACAAATT— 3′; 5′— —ACAAACT— 3′ și 5′—ATAAACT—3′.

ADN repetitiv poate fi ușor separat prin ultracentrifugare izopicnică și supus secvențierii. O semnificație deosebită o au secvențele repetate de ADN cu bisimetrie rotatorie (cap. IX), întîlnite atît la

Scanned with OKEN Scanner

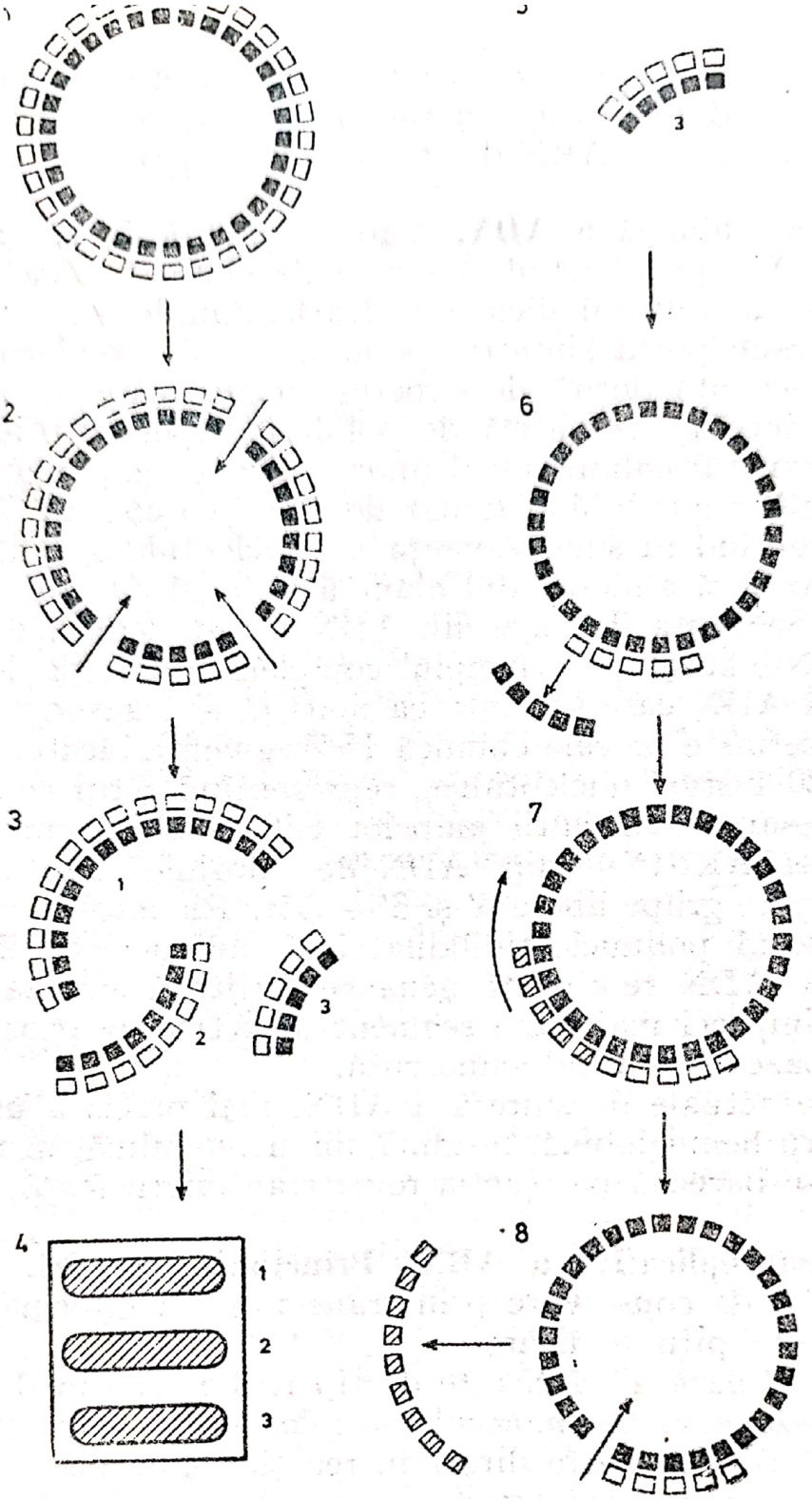


Fig. 12. **Metoda „+" şi „—„ de determinare a secvenţei de nucleotide.** Se începe cu ADN bicatenar extras din celule bacteriene infectate cu fag (1); are loc clivarea cu enzime de restricţie (2) producîndu-se fragmente (3) ce sînt separate după dimensiune prin electroforeză pe gel (3). Unul dintre fragmente este ales (5) spre a servi ca primer pentru secvenţiere. Incubată cu o matriţă monocatenară de ADN viral, catena complementară a primerului este asociată la matriţă prin împerechere de baze (6). Acum se sintetizează noul ADN: nucleotide succesive (blocurile haşurate) sînt adăugate (7) în condiţii variate spre a extinde moleculele de ADN viral ce vor fi separate prin acţiunea enzimelor de restricţie (8) înainte de a fi analizate pentru secvenţa de nucleotide (după **J. C. Fiddes**, 1977, *The nucleotide sequence of a viral DNA*. „Sc. American" **237, 6**, 55—67).

Scanned with OKEN Scanner

procariote (PK), cît și la eucariote (EK) la nivelul unor situri de restricție și modificare din macromolecula ADN, la nivelul siturilor promotoare în sinteza ARN de transfer etc.

8. **Sinteza chimică a ADN.** A fost realizată de Khorana și colab. (Agarwal, 1970) prin metode chimice de sinteză a legăturilor internucleotidice cu ajutorul diciclohexilcarbodiimidei sau sulfonilcloridei aromatice. S-au putut sintetiza pe această cale polidezoxiribonucleotide cu o secvență dorită de experimentator, care apoi au putut fi folosite în sinteza enzimatică de polidezoxiribonucleotide în sisteme acelulare. Punctul culminant al unor asemenea experiențe a fost sinteza unui fragment dublu-catenar de ADN ce conține 77 perechi de baze reprezentînd în sine secvența de nucleotide a genei ce codifică ARN ce transferă aminoacidul alanină la locul de sinteză proteinică la drojdie. Secvența de baze din ADN a fost dedusă după secvența acestui ARNt, bazat pe principiul complementarității de baze dintre monocatena ADN care servește ca matriță și transcriptul său ARN. Au fost sintetizate pe cale chimică 15 fragmente bicatenare ce conțin între 5 și 20 resturi nucleotidice, reprezentînd setul complet de fragmente necesare construirii ambelor catene ale segmentului considerat (genei $ARNt^{Ala}$) din ADN de drojdie. Toate fragmentele aveau la capete grupe libere 3′ și 5′— OH. Ele au fost unite enzimatic cu ajutorul polinucleotidilkinazei și polinucleotidilligazei. Acest fragment de ADN reprezintă gena ce dirijează sinteza $ARNt^{Ala}$ și în același timp cel mai mare segment de ADN eucariot a cărui secvență de baze este total cunoscută.

Metodele actuale de sinteză a ADN, mai precis a unor gene din ADN (pentru hemoglobină, insulină, imunoglobulină, histone, ovalbumină etc.) se bazează pe reacția reverstranscrierii (cap. V).

9. **Sinteza replicativă a ADN. Principiile reacției.** Funcția de bază a ADN, de conservare prin transmitere a informației genetice, se îndeplinește prin replicare.

Sinteza celulară a ADN este de tip replicativ sau de tip copiere, căci în sinteza unei noi molecule se folosește ca matriță o moleculă preexistentă care ia parte direct în reacție. Molecula nou sintetizată este identică cu molecula veche, este copia sa fidelă, adică replica sa.

Sinteza replicativă este o reacție chimică fundamentală în lumea vie, unică pentru ADN al tuturor sistemelor biologice și pentru ARN al ribovirusurilor. Ea duce la dublarea informației genetice în vederea repartizării sale echilibrate în celulele fiice, asigurînd astfel continuitatea vieții. Replicarea ADN este o problemă centrală a biologiei (Alberts și Sternglanz, 1977). Biosinteza ADN apare ca o reacție de polimerizare a dezoxiribonucleozid monofosfaților

Scanned with OKEN Scanner

care participă în reacție sub formă de trifosfați activați de către kinazele corespunzătoare printr-o unire prealabilă cu grupa pirofosfat (PP), conform reacției:

$$d\ (NMP) + ATP \xrightarrow{\text{adenilatkinaza}} d\ (NDP) + ADP$$

$$d\ (NDP) + ATP \xrightarrow{\text{nucleoziddifosfatkinaza}} d\ (NTP) + ADP.$$

Replicarea macromoleculei ADN se bazează pe proprietățile structurale intrinsece, și anume complementaritatea bazelor azotate și unirea catenelor complementare prin legături de hidrogen. Principiul complementarității stricte stă la baza exactității replicării iar existența legăturilor de hidrogen condiționează o separare rapidă și totodată o unire rapidă a catenelor complementare. Aceste proprietăți, desprinse din modelul Watson-Crick (1953 *a*), au stat la baza elaborării modelului semiconservativ de replicare intuit teoretic de aceiași autori (Watson, Crick, 1953 *b*). În cadrul acestui model semiconservativ de replicare are loc separarea celor două catene complementare ale moleculei vechi de ADN, fiecare servind ca matriță pentru sinteza unor catene noi complementare matrițelor (Watson și Crick, 1953 *b*; Delbruck și Stent, 1957). Rezultă în final două molecule fiice identice între ele, pe de o parte, și cu cea inițială pe de alta, în care o catenă este veche (cea care a funcționat ca matriță) iar alta este nou sintetizată (replica). Astfel, o moleculă veche își pierde identitatea prin sinteza a două noi molecule identice sieși. În acest fel, prin replicare se asigură transferul informației genetice de la ADN parental la ADN fiu, transmiterea sa de la o generație celulară la alta și deci conservarea sa de-a lungul generațiilor. Demonstrarea modelului semiconservativ de replicare a ADN a fost realizată de către Meselson și Stahl (1958), în cadrul unei experiențe de transfer izotopic, în care *E.coli* a fost cultivată pe un mediu la care sursa de azot NH_4Cl conținea în loc de azotul obișnuit ^{14}N, izotopul său greu și stabil (neradioactiv) ^{15}N. Crescute timp de mai multe generații celulare pe un asemenea mediu, bacteriile incorporau în ADN acest izotop greu ^{15}N. Acest ADN extras și ultracentrifugat în gradient de CsCl bandează la un nivel distinct, diferit de acela la care bandează ADN extras de la celule crescute pe mediu cu azot obișnuit (^{14}N). Cînd se extrage ADN de la celule crescute pe mediu cu ^{14}N și ADN de la celule crescute pe mediu cu ^{15}N, după care se amestecă și se ultracentrifughează în gradient de CsCl, se constată că în tubul de ultracentrifugă apar două benzi distincte, una corespunzătoare la ADN „ușor", ^{14}N, iar cealaltă corespunzînd la ADN „greu", ^{15}N. În cadrul experienței de transfer, celulele crescute timp de multe generații pe mediu cu ^{15}N, al căror ADN era „greu", au fost transferate pe mediu cu ^{14}N, unde au fost lăsate să crească, astfel că tot azotul

Scanned with OKEN Scanner

asimilat și deci orice catenă polinucleotidică nou sintetizată era de tip „ușor", adică cu ^{14}N. La diferite perioade de timp după transferul pe mediul cu ^{14}N s-a extras ADN de la aceste bacterii și a fost centrifugat în gradient de densitate de CsCl. Cînd s-a extras ADN de la culturile lăsate pe mediu cu ^{14}N pentru un timp ce corespunde unei singure generații celulare, adică unei singure runde de replicare a ADN, și s-a ultracentrifugat, s-a constatat că acesta bandează la un nivel intermediar între ADN ^{14}N și ADN ^{15}N. Cu alte cuvinte, după un ciclu de replicare apare un ADN hibrid $^{14}N—^{15}N$, în care o catenă (cea veche) conține ^{15}N, pe cînd catena nou sintetizată conține ^{14}N. Cînd s-a extras ADN după o perioadă de timp care corespunde la două runde de replicare (două diviziuni celulare) și s-a centrifugat, s-a constatat că jumătate din acesta bandează la nivelul benzii hibride $^{15}N—^{14}N$, pe cînd cealaltă jumătate bandează la nivelul unei benzi caracteristice pentru ADN „ușor", ^{14}N. Raportul dintre ADN hibrid și ADN „ușor" este deci de 1 : 1. După trei generații celulare acest raport este de 1 : 2, după patru de 1 : 3, ș.a.m.d. Aceste rezultate privind distribuția atomilor parentali ^{15}N din ADN de *E. coli* arată că ea se desfășoară după un model semiconservativ, în deplin acord cu schema propusă de către Watson și Crick, privind mecanismul molecular de replicare a ADN. Spre a elimina posibilitatea ca datele de mai sus să reprezinte rezultatul unui model dispersiv de replicare sau ale unui model conservativ, cei doi autori au procedat la denaturarea ADN „ușor", „greu" și hibrid și la ultracentrifugarea monocatenelor în gradient de densitate de CsCl. Analiza modelului de bandare a monocatenelor a fost în acord doar cu modelul semiconservativ de replicare și a exclus posibilitatea celorlalte două modele.

La nivelul cromozomului eucariotic, modelul semiconservativ de replicare a ADN a fost demonstrat de către Taylor și colab. (1957, 1958) la plante și Delbrück și Stent (1957) la animale, folosind marcajul radioactiv al ADN cu ^{3}H-timidină. Replicarea se realizează prin intervenția unui aparat enzimatic complex. Caracterul enzimatic al reacției este demonstrat în perioada 1955—1961 în laboratorul lui Kornberg (Kornberg, 1957, 1960, 1961; Bessman și colab., 1958). Activitatea enzimei care catalizează reacția de polimerizare în cadrul sintezei noii catene complementare este dependentă de matriță, această enzimă numindu-se ADN-polimeraza dependentă de ADN.

10. **Sinteza in vitro a ADN.** Se desfășoară în prezența unei monocatene macromoleculare de ADN ce funcționează ca matriță, dezoxiribonucleozid — 5′ — trifosfații celor patru baze azotate, o enzimă purificată care a fost denumită ADN-polimeraza I (enzima lui Kornberg) și ioni de Mg^{2+}. În cadrul reacției are loc o aliniere ordonată, succesivă și selectivă a dezoxiribonucleotidelor libere pe matriță, potrivit complementarității lor cu bazele azotate ale matriței cu care

Scanned with OKEN Scanner

se unesc prin punți de hidrogen. În același timp, între nucleotidele aliniate se stabilesc legături covalente fosfodiesterice 3′—5′, realizîndu-se astfel o catenă nouă, complementară matriței și în același timp o structură dublu-catenară ADN.

Formarea unei legături fosfodiesterice are la bază atacul nucleofilic al oxidrilului din poziția 3′ al pentozei unui nucleotid asupra legăturii macroergice dintre primul și al doilea rest fosforic al grupării trifosfat din poziția 5′ a pentozei nucleotidului care s-a aliniat pe matriță în vecinătatea acestuia. Atacul nucleofilic reprezintă desfășurarea unei reacții de esterificare și se bazează pe mai marea afinitate a oxidrilului din poziția 3′ pentru primul rest fosfat (α) din gruparea PPP, deoarece acesta este mai sărac în electroni avînd o sarcină nucleară, de unde numele de atac nucleofilic. Atacul nucleofilic este catalizat de ADN-polimerază și duce la formarea de legături covalente fosfodiesterice de tip 3′-fosfat — 5′ cu eliberarea de PP. În cadrul reacției intervine și enzima pirofosfatază care hidrolizează PP cu eliberarea de energie folosită pentru înaintarea matriței ADN pe molecula de polimerază, creînd posibilitatea realizării de atacuri nucleofilice succesive.

O caracteristică unică a ADN-polimerazei este aceea că alegerea substratului (dezoxiribonucleotidului) este determinată de matriță pe baza complementarității de baze. Din această cauză, ADN-polimerazele bacteriene pot sintetiza ADN animal, iar cele din țesuturile animale pot sintetiza ADN bacterian, depinzînd de tipul de ADN ce funcționează ca matriță și care este prezent în sistemul acelular de sinteză. Se desprinde concluzia că ADN-polimerazele nu trebuie să fie înzestrate cu capacitatea de recunoaștere a unei secvențe specifice de baze de pe ADN matriță. Sinteza *in vitro* a noii catene se realizează în direcția 5′→3′.

Prin utilizarea unei matrițe reprezentate de ADN monocatenar al fagului ΦX174 se sintetizează duplexuri ADN care după denaturare termică dau monocatene ce s-au dovedit a fi biologic active, asigurînd reproducerea de noi particule virale, în celula gazdă de *E. coli* (Goulian și Kornberg, 1967).

Cercetările din ultimul deceniu au putut stabili clar deosebirea dintre sinteza reparatorie de ADN și sinteza sa replicativă, realizată în vederea duplicării și continuității ereditare. Sinteza reparatorie se realizează la nivelul unor regiuni scurte — cele afectate de leziuni — după un model dispersiv în cadrul căruia are loc destrămarea catenei. Sinteza replicativă implică întreaga moleculă de ADN, cu păstrarea integrității catenelor.

11. Aparatul enzimatic al replicării. ADN-polimerazele. Au fost descrise trei ADN-polimeraze notate în ordinea descoperirii lor: I, II, III. Existența și funcția lor pot fi evidențiate prin studiul

Scanned with OKEN Scanner

unor mutanți ce au afectate genele structurale care le specifică (De Lucia și Cairns, 1969; Richardson, 1969; Gefter și colab., 1971).

1. *ADN-polimerazele bacteriene. ADN-polimeraza I*, numită pe scurt *pol I* sau *pol A*, este de obicei cunoscută și sub denumirea de enzima lui Kornberg. Ea a fost izolată din *E. coli*. Din 100 kg de celule bacteriene s-a extras 0,6—1 g de enzimă. Are greutatea moleculară de 109 000 daltoni. La 37 °C are o capacitate de polimerizare de 667 nucleotide pe minut. Este formată dintr-o catenă polipeptidică alcătuită din 975 aminoacizi care prezintă și o legătură disulfidică și 1 pînă la cîțiva atomi de Zn, indispensabili pentru funcționarea ei. ADN-polimeraza I nu poate folosi ca matriță ADN bicatenar. Dacă în acesta apar incizii monocatenare el poate fi folosit eficient ca matriță de către această enzimă. Implicată inițial în replicare ca enzimă esențială, ulterior s-a dovedit că ADN-polimeraza I joacă rol esențial în sinteza reparatorie și rol secundar în replicare.

Funcțiile sale de bază sînt: polimerizarea în direcția 5′→3′, pirofosforoliza și disocierea exonucleazică 3′→5′ și 5′→3′. Descoperirea tulpinii 3478 de *E. coli* care prezintă o activitate ADN-polimerazică I foarte scăzută sau inexistentă (din care cauză a fost desemnată drept mutantă pol A_1), dar la care sinteza ADN se desfășoară normal, a pus sub semnul întrebării rolul ADN-polimerazei I în replicare, dînd sprijin ideii despre existența altor enzime polimerazice. S-a mai constatat că mutantul pol A_1 poate să crească normal, dar este foarte sensibil la iradiere cu UV sau radiomimetice (metilmetansulfonat, de exemplu), ceea ce înseamnă că nu posedă aparatul enzimatic de excizie reparatorie a leziunilor induse de acești factori. Cum activitatea ADN-polimerazică I era practic nulă la această tulpină, s-a tras concluzia că enzima ADN-polimeraza I este o enzimă de reparare, nu de replicare propriu-zisă. Ultimele cercetări genetice și biochimice atestă că enzima este indispensabilă și în replicare (Kornberg, 1974), dar ea intervine în etapa finală a replicării, activitatea sa fiind legată, ca și aceea a enzimei ADN-ligază, de umplerea golurilor care apar între fragmentele scurte de ADN discontinuu sintetizate în cadrul mecanismului de replicare de tip Okazaki. Ea intervine apoi în disocierea ARN primer și umplerea golurilor ce rămîn în urma unei asemenea activități hidrolitice, ca și în translația crestăturilor monocatenare prin activitatea sa exonucleazică 5′→3′.

Lehman (1976) consideră că în pofida faptului că ADN-polimeraza I nu este esențială pentru reacția de polimerizare în replicare, ea este o enzimă esențială în replicare, prin activitățile sale exonucleazice. Aceste constatări au făcut să fie intensificate eforturile pentru descoperirea altor polimeraze.

ADN-polimeraza II (*pol II*) *de E. coli* este o polimerază dependentă de ADN, asociată membranei celulare. Are o GM = 120 000 daltoni. Folosește ca matriță ADN bicatenar cu incizii monocatenare

Scanned with OKEN Scanner

iar ca substrat, cele patru dNTP în prezența Mg^{2+}. Manifestă activitate exonucleazică 3′→5′, dar nu și activitate exonucleazică 5′→3′. Este legată de repararea leziunilor induse de UV în ADN sau umplerea golurilor dintre fragmentele ADN discontinuu sintetizate. Această enzimă nu este implicată direct în vreo etapă a replicării, deci nu poate fi considerată o enzimă de replicare. Activitatea sa este afectată de mutația genei pol B, fără a fi afectată și viabilitatea celulei:

ADN-polimeraza III (pol III sau pol C). Reprezintă produsul specificat de gena structurală *dna E*, fiind o proteină termolabilă care joacă rol esențial în replicarea *in vivo* la *E. coli* și *Bacillus subtilis*. Sintetizează ADN în direcția 5′→3′, necesitînd primer, Mg^{2+} și cele patru dNTP pentru reacția *in vitro*. Este responsabilă de sinteza discontinuă a fragmentelor scurte de ADN numite piese Okazaki. Rata de polimerizare este de 2000 nucleotide pe secundă. Nu prezintă activitate exonucleazică 5′→3′. ADN-polimeraza III este considerată în prezent enzima de replicare propriu-zisă. Ea poate extinde numai catene oligonucleotidice preexistente, sau molecule primer, dar nu poate iniția „de novo" noi catene ADN din monomeri dezoxiribonucleozidici trifosfați. Se leagă la ADN la nivelul adînciturii mari.

S-a mai descris și enzima pol III* care condiționează trecerea monocatenei circulare de ADN ΦX147 în forma sa replicativă (RF) dublu-catenară. Această enzimă necesită pentru reacție o proteină suplimentară, copol III*, în asociație cu care formează o holoenzimă tetramerică ($\alpha_2\beta_2$).

2. *ADN-polimerazele eucariote.* La eucariote aparatul enzimatic al replicării este mai complex (Loeb, 1974), existînd ADN-polimeraze nucleare, mitocondriale și cloroplastice. ADN-polimeraza nucleară este intens sintetizată înaintea fazei S, scăzînd la sfîrșitul acesteia. ADN-polimerazele eucariote (Loeb, 1974; Weissbach și colab., 1975) se clasifică în polimeraze mari (GM= 200 000 daltoni) și polimeraze mici (GM = 100 000 daltoni). Polimerazele mari sînt localizate în citoplasmă în cele mai multe țesuturi și în nucleu în celulele care se divid rapid. Polimeraza nucleară mică a fost găsită și în citoplasmă. ADN-polimerazele eucariote nu prezintă activități exonucleazice. Polimerazele mari necesită grup liber 3′ —OH și folosesc ca primer oligoribonucleotide. La eucariote degradarea *ARN* primer este realizată de RN-aza H din timus de vițel care de asemenea disociază specific ARN din hibridul molecular ADN—ARN. Grupul 3′—OH poate fi oferit chiar de capătul matriței prin pliere înapoi pe ea însăși, avînd loc apoi atașarea secvențială a nucleotidelor libere. Spre deosebire de ADN-polimeraza I bacteriană, care în prezența Mn^{2+} sau Mg^{2+} poate folosi ca substrat și ribonucleotide, polimerazele eucariote nu polimerizează ribonucleozid-trifosfații.

3. *ADN-polimerazele dependente de ARN.* Folosesc ca matriță ARN, din care cauză se mai numesc reverstranscriptaze sau invers-

Scanned with OKEN Scanner

transcriptaze, şi au fost descrise în virionii virusurilor oncogene ARN, ca şi în unele celule animale (cap. V).

Recent s-a mai descris şi o altă enzimă polimerazică ce catalizează polimerizarea dezoxiribonucleozidelor trifosfat fără a depinde de matriţă (Bollum, 1974). Ea a fost numită terminal-dezoxinucleotidiltransferaza (TdT), deoarece determină adiţia terminală a dNTP, alungind printr-o reacţie de polimerizare cu condensare liniară o catenă iniţiatoare la capătul său 3′.

12. **Alte enzime participante în replicare.** 12. *Proteinele destabilizatoare.* În vederea replicării ADN cele două catene ale duplexului ADN trebuie să se separe spre a funcţiona ca matriţă. Dezrăsucirea bicatenei la nivelul bifurcaţiei formate în timpul replicării se realizează cu folosirea energiei eliberate de ATP. Recent au fost descoperite şi unele proteine care slăbesc stabilitatea bicatenei, ele legîndu-se specific de monocatenele separate. Prima proteină de acest tip a fost identificată ca produs al genei 32 a fagului T_4, despre care se ştia că este necesar atît în replicare, cît şi în recombinare. Ea a fost numită unwindază sau proteina HD — destabilizatoare a dublului-helix (Signal şi colab., 1972). Întrucît înlesneşte denaturarea ADN, aceasta a mai fost numită proteina de „topire" a ADN. Totodată ea facilitează renaturarea corectă (înfăşurarea corectă a catenelor), deoarece blochează formarea punţilor de hidrogen intracatenare la nivelul monocatenelor cînd acestea se ghemuiesc după denaturare. Sub acţiunea proteinei HD sinteza ADN este intensificată de 5—10 ori. De formă alungită (fibrilară), molecula acestei proteine se înfăşoară pe monocatena ADN în maniera latură pe latură, pe o lungime corespunzînd la 10 nucleotide. Legarea preferenţială la monocatenele ADN a unwindazei previne reunirea catenelor parentale (matriţele). Are o GM=35 000 daltoni, prezentînd specificitate pentru monocatenele ADN, nu şi pentru ARN. S-a mai descris şi o altă proteină care denaturează preferenţial regiunile bogate în AT jucînd un rol important atît în recombinare, cît şi în replicare. Ea are GM=22 000 daltoni. Un mutant amber de T_4 are afectată gena 32 şi nu poate desfăşura nici replicarea şi nici recombinarea (Alberts şi Frey, 1970), de unde se dovedeşte rolul esenţial al proteinei HD în aceste procese. Proteina HD se leagă la monocatenele matriţă în regiunea bifurcaţiei de replicare, menţinîndu-le în această stare monocatenară şi susţinînd desfacerea (topirea) locală succesivă a structurii bicatenare, condiţionînd conformaţia optimă a ADN care să permită expunerea bazelor în vederea împerecherii cu nucleotidele libere, proteina HD cooperînd cu polimeraza în procesul de replicare. Fiecare complex de replicare conţine circa 170 molecule ale proteinei HD. La fagul M_{13}, proteina HD este specificată de gena 5. Ea denaturează forma replicativă, bicatenară a ADN fagic şi prote-

Scanned with OKEN Scanner

jează monocatenele față de nucleaze în timpul asamblării lor în noile particule fagice.

2. *Proteina ce îndepărtează buclele superspiralizate.* Desfacerea unor molecule liniare foarte lungi de ADN se realizează printr-un mecanism care funcționează pe principiul pivotului, mecanism care este esențial și în replicarea unei molecule circulare, covalent închise.

Funcția de pivot are la bază acțiunea conjugată a unei endonucleaze — swivelază — (care determină incizii monocatenare în ADN bicatenar, slăbind forța de răsucire și reducînd superspiralizarea) și a unei polinucleotid-ligaze (care umple tăietura monocatenară, refăcînd integritatea covalent — liniară sau circulară a dublei spirale). La *E. coli* a fost însă descoperită o altă proteină capabilă de a despiraliza bicatena superspiralizată. Ea a fost numită proteina omega (ω), avînd o GM= 100 000 daltoni. Dependentă de ATP, această proteină înlătură încolăcirile superelicoidale pozitive din ADN circular închis sau liniar, conjugîndu-și acțiunea cu aceea a proteinei HD. La nivelul superspiralei această enzimă determină o incizie monocatenară, legîndu-se apoi covalent de grupele 5′-fosfat și 3′—OH, păstrîndu-se astfel energia punții fosfodiesterice. Prin rotirea (pivotarea) acestor capete libere față de axa spiralei are loc relaxarea superspiralei, după care puntea fosfodiesterică este refăcută, eliberîndu-se proteina de relaxare (pivotaza). În sistemele procariote s-a descris și enzima ADN-giraza care are rolul de a introduce tururi supraelicoidale în ADN nou sintetizat fiind dependentă de ATP. Activitatea sa este contrabalansată de enzime nucleazice de tip crestare-închidere (*nicking-closing enzimes*). La eucariote au fost descrise enzime asemănătoare.

ADN-giraza procariotă catalizează introducerea dependentă de ATP a torsadelor negative în ADN bicatenar circular, închis, de *E. coli* (Smith & Kubu Imamoto, 1978). Această activitate este cerută de replicarea cromozomului de *E. coli*, a plasmidelor și a bacteriofagilor ca și de integrarea recombinatorie a profagului lambda (λ).

ADN-giraza este inhibată de acidul nalixidic (NAL) și acidul oxolinic, ca și de antibioticele coumermicină și novobiocină.

Activitatea de închidere a crestăturilor (*nick closing*) cerută în reacția de superspiralizare are la bază proteina țintă NAL, desemnată pnal, deoarece relaxarea ADN superspiralizat catalizată de ADN-giraza independentă de ATP este inhibată de NAL, și acidul oxolinic, dar nu și de novobiocină sau coumermicină și incubația ADN-girazei a ADN și a acidului NAL sau oxolinic duce la formarea unui complex de tip relaxat. La doze mici, NAL este inhibitor specific al replicării ADN la *E. coli*. La doze mari el inhibă și transcrierea.

3. *ADN-ligaza.* Este enzima care catalizează sinteza punților fosfodiesterice dintre grupe adiacente 5′-fosforil și 3′—OH de la nivelul unor crestături monocatenare din ADN bicatenar, avînd loc totodată disocierea punții pirofosfatice a nucleoziddifosfatului la *E. coli*

Scanned with OKEN Scanner

sau a punții α—β — pirofosfat a ATP la fagul T_4 (Lehman, 1974). Asemenea enzime sînt implicate în două procese fundamentale:

1. excizia-repararea leziunilor din ADN induse de iradiere UV sau substanțe radiomimetice;

2. unirea segmentelor ADN sintetizate în cadrul mecanismului discontinuu de replicare a ADN cu formarea unei catene continue.

La *E. coli*, ADN-ligaza reprezintă o catenă polipeptidică cu GM = = 75 000—77 000 daltoni, iar ADN-ligaza codificată de genomul fagului T_4 are o GM = 63 000—68 000 daltoni.

Sinteza punții fosfodiesterice se realizează în 3 etape:

I — atacul nucleofilic al grupei ε-amino a unui rest lizină al enzimei asupra fosfatului adenilil al nucleoziddifosfatului cu formarea complexului ligază-adenilat și eliberarea de nicotinamidă-mononucleotid (NMN).

II — transferul grupului adenilil (AMP) de la enzimă la capătul 5′-fosforil al tăieturii din ADN spre a genera o nouă punte pirofosforică;

III — atacul asupra grupului 5′-fosforil efectuat de grupul 3′—OH cu formarea unei punți fosfodiesterice și eliberarea AMP. Depinzînd de ATP, ligaza poate determina de asemenea relaxarea superelicelor ADN pozitive sau negative. Sinteza ADN-ligazei specificate de T_4 este dirijată de gena 30. În condiții restrictive, mutanții condițional letali pentru gena 30 sintetizează o cantitate mică de ADN, iar acest ADN se află sub forma unor fragmente mici, cu coeficientul de sedimentare 10 S care, în lipsa ADN-ligazei, nu se pot uni într-o catenă continuă. Din această cauză rolul ADN-ligazei în replicare este esențial. Deficiențe în activitatea ligazică sînt remarcate și la mutantul *ligts 7* al tulpinii K_{12} de *E. coli*, termosensibil și condițional letal (neviabil la 42 °C, dar crește normal la 30 °C). Deși crește la 30 °C, acest mutant este încă deficient în capacitatea de a repara leziunile induse în ADN de iradierea UV sau agenți alkilanți. La 42 °C are loc, în lipsa unei activități ligazice normale, o acumulare de fragmente de ADN 10 S care nu pot fi unite într-o catenă continuă în procesul de replicare discontinuă. Rezultă că ADN-ligaza este o enzimă esențială atît pentru procesul de replicare, cît și pentru procesul reparator. Purificată, această enzimă stă la baza obținerii de ADN recombinat.

13. **Concluzii.** Procesul replicării ADN se bazează pe activitatea unui complex echipament enzimatic. ADN-polimerazele sînt esențiale pentru polimerizarea dezoxiribonucleotidelor, proteinele destabilizatoare — pentru asigurarea deplasării bifurcației de replicare iar ligaza — pentru îndepărtarea crestăturilor monocatenare și unirea într-o monocatenă unitară a fragmentelor scurte de ADN discontinuu sintetizate. Endonucleazele joacă și ele un rol multiplu în replicare: ele determină incizii monocatenare reprezentînd puncte de start în replicare sau

Scanned with OKEN Scanner

reparare, sau constituind pivotul care condiționează relaxarea superspiralei în timpul replicării. Tot ele asigură excizia fragmentului de ARN primer, translația tăieturilor care întrerup replicarea, formarea fondului de precursori ai sintezei ADN fagic rezultat din hidroliza ADN al celulei gazdă infectate de virus, maturarea și asamblarea cromozomilor virali pentru care sînt necesare tăieturi specifice etc.

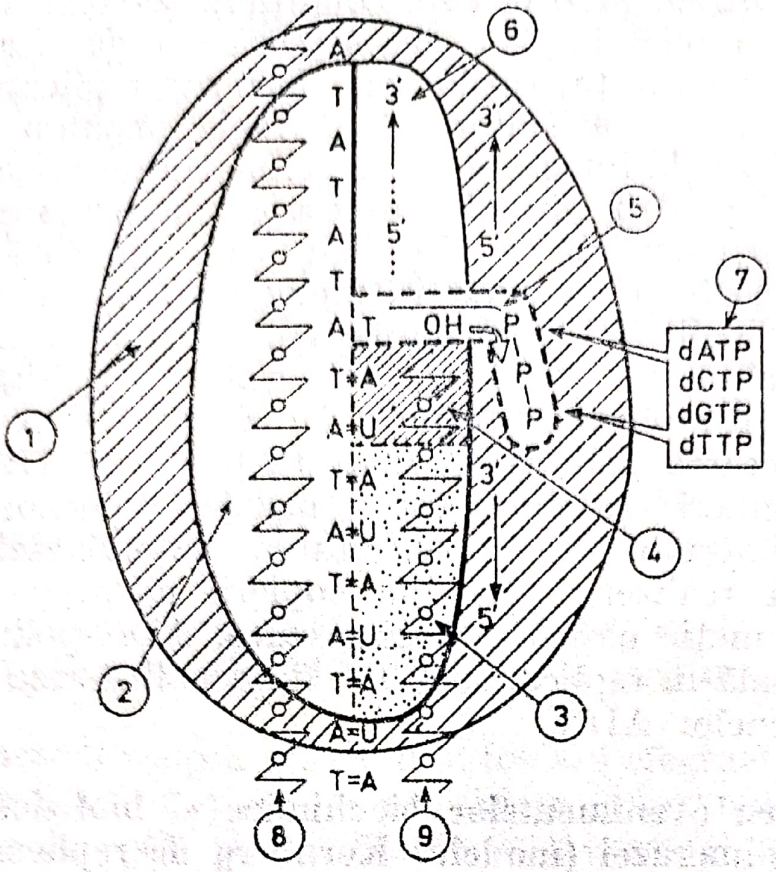
ADN-polimeraza I (enzima lui Kornberg) este implicată în repararea leziunilor din ADN și secundar în replicare. Ea intervine într-o etapă mai tîrzie a replicării cînd umple golurile dintre fragmentele Okazaki, suprapunîndu-se astfel cu activitatea ADN-ligazei. Dar rolul său principal în replicare este jucat de activitatea exonucleazică 5′→3′ prin care această polimerază înlătură primerul ARN și realizează printr-o polimerizare simultană translația golurilor create în urma exciziei primerului. Prin activitatea exonucleazică 3′→5′ ADN-polimeraza I realizează corecția copierii matriței. ADN-polimeraza II are o funcție oarecum necunoscută. ADN-polimeraza III are funcția principală în replicarea ADN, fiind polimeraza de inițiere și elongație a catenelor ADN.

14. Desfășurarea evenimentelor biochimice și biofizice la nivelu sitului activ al polimerazei (modelul Kornberg de replicare a ADN) Molecula ADN-polimerazei are formă globulară cu un diametru de 65 Å, oferind un spațiu corespunzător la unul sau cîteva tururi de spiră de dublu helix — ADN. Între aceste două macromolecule, în vederea replicării se stabilește un contact pe o porțiune de ADN ce corespunde la cel puțin 20 perechi de baze (două tururi de spiră). Se admite că în centrul activ al enzimei (Kornberg, 1974) există cel puțin 5 situri de bază (fig. 13). Astfel, situl legării la matrița monocatenară leagă nucleotidele matriței în zona în care trebuie să se formeze perechile de baze complementare incluzînd și cîteva nucleotide adiacente.

Situl legării capătului catenei în creștere (situl primerului) se află adiacent sitului de recunoaștere specifică a grupului 3′-OH al nucleotidului terminal al primerului. Mai există situl pentru dezoxiribonucleozidtrifosfat și situl pentru disocierea exonucleazică 5′→3′ a catenei ADN, sit plasat înaintea celui de legare a trifosfatului. Cei patru dezoxiribonucleozid-monofosfați concurează pentru situl legării capătului primerului, sit diferit de cel de legare a trifosfatului. Legarea în acest sit este dependentă de Mg^{2+}. Studii de rezonanță magnetică nucleară au arătat că ionii bivalenți servesc drept punte între enzimă și grupul α-fosforil al dNTP care se aliniază pe matriță.

Legarea ADN-polimerazei la matrița ADN a fost dovedită electronomicroscopic și prin studii de ultracentrifugare a diferitelor tipuri de ADN marcate cu ^{3}H sau ^{32}P amestecate cu polimeraza marcată cu ^{203}Hg, separîndu-se în gradient de zaharoză complexe ADN-ADN-

Scanned with OKEN Scanner



Legendă:

1 enzima lui Kornberg (ADN-polimeraza I)
2 sit pentru matriță
3 sit pentru primer
4 sit pentru capătul 3'OH al primerului
5 sit pentru trifosfat
6 capătul 3' al catenei nou sintetizate
7 rezerva celulară a celor patru dezoxinucleotidtrifosfați
8 matrița ADN
9 primerul ARN
⇨ atacul nucleofilic
···5'···→3' activitatea de polimerizare (sensul de creștere al catenei noi)
5'→3' } activități exonucleazice
3'→5' }

Fig. 13. Schema siturilor centrului activ al ADN-polimerazei I (modificat după Kornberg, 1974).

polimerază (foto IV). Enzima se leagă preferențial la nivelul unor crestături monocatenare din duplexul ADN care oferă capete libere 3'-OH. Ea se poate asocia și cu ADN circular monocatenar, nu însă și cu cel bicatenar. Acesta din urmă poate funcționa ca matriță numai dacă enzimele nucleazice determină în el crestături monocatenare.

Situl pentru matriță prezintă specificitate pentru capătul 3' al acesteia, polimeraza neputînd să interacționeze la capătul 5' sau cu vreo porțiune intercalară a matriței. În situl pentru primer se atașează un oligonucleotid cu funcția de primer iar în situl pentru trifosfat un dezoxinucleozidtrifosfat a cărui bază azotată este complementară bazei azotate din matriță. Are loc primarea (inițierea) noii catene prin condensarea (formarea legăturii fosfodiesterice) capă-

Scanned with OKEN Scanner

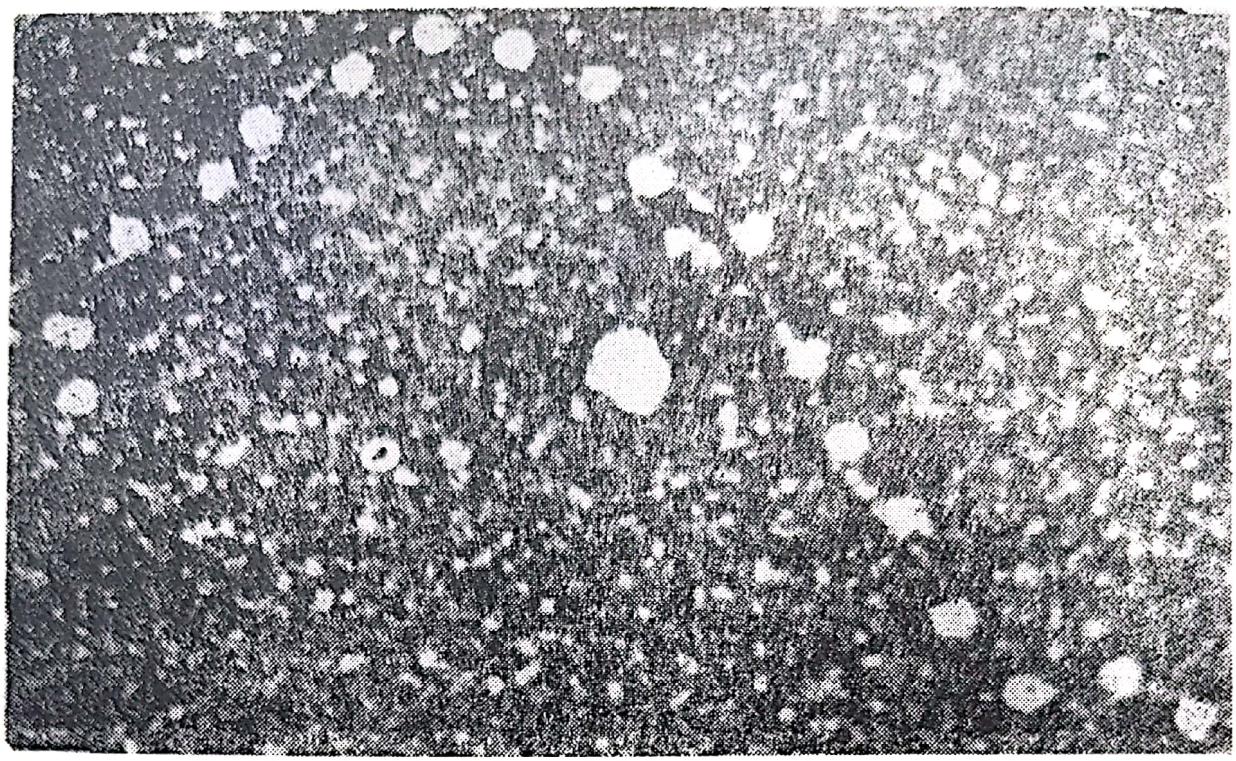


Foto IV — **Molecule de ADN-polimerază I asociate la un duplex ADN,** sintetizat în eprubetă și care conține crestături monocatenare la intervale regulate. Cîte o moleculă de polimerază se atașează la un grup 3′—OH la nivelul fiecărei crestături (după Griffith, din Goodenough și Levine, 1974).

tului liber 3′-OH al primerului și a 5′-fosfatului nucleotidului aliniat pe matriță în urma formării legăturilor de hidrogen cu baza complementară din aceasta. Complexul polimerază-matriță-primer (fig. 13, 14) se află în mijlocul amestecului celor patru dNTP care concurează pentru situl dezoxiribonucleozidtrifosfat. În acest sit se va atașa doar acel dezoxiribonucleozidtrifosfat care, la nivelul corespunzător la care a ajuns ADN-polimeraza pe matriță, prezintă baza azotată complementară cu aceea din matriță. Cînd pe această cale se realizează o pereche corectă de baze complementare, enzima răspunde prin modificări conformaționale, care asigură desfășurarea în continuare a polimerizării. Dacă în situl pentru trifosfat a pătruns un nucleotid necorespunzător, aceste modificări conformaționale nu au loc și reacția de polimerizare nu este desfășurată decît numai după îndepărtarea acestuia. Toate perechile de baze Watson-Crick au dimensiuni și geometrie identice. Cînd se formează o pereche corectă de baze complementare mișcarea de translație a matriței față de enzimă se sincronizează cu formarea unei punți fosfodiesterice. Această mișcare antrenează totodată nucleotidul nou adăugat în situl pentru capătul primer, lăsînd liber situl trifosfat pentru nucleotidul următor. Nucleotidul din situl pentru capătul primer oferă acum un capăt liber 3′-OH care va efectua un atac nucleofilic asupra grupului 5′-fosfat al următorului nucleotid aliniat pe matriță ș.a.m.d., pînă ce matrița este complet parcursă. Reacția de polimerizare încetează

Scanned with OKEN Scanner

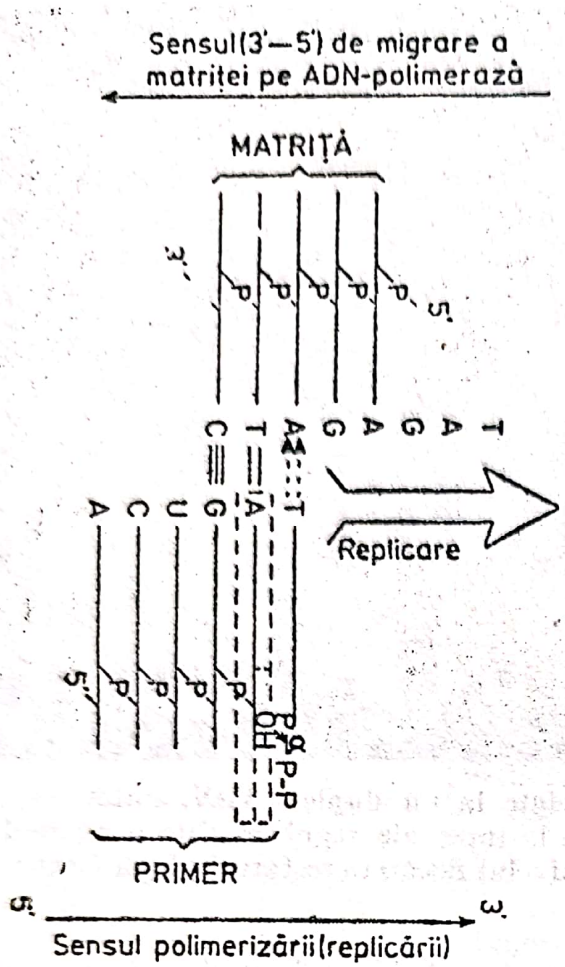


Fig. 14. Complexul matriță-primer în replicarea ADN.

cînd mai departe, în fața capătului primer, nu mai este matriță disponibilă. Esterificarea 3′-fosfat-5′ cu formarea punții fosfodiesterice este însoțită de eliberarea PP care, disociat prin activitatea pirofosfatazei pune în libertate energia necesară înaintării matriței pe molecula de ADN-polimerază, sau viceversa.

Replicarea fidelă catalizată de ADN-polimerază și esențială în asigurarea continuității vieții nu se poate baza numai pe împerecherea de baze complementare, căci pot apărea și împerecheri incorecte, fie datorită unor defecte în polimeraza însăși, fie datorită unor schimbări tautomerice în care forma enolică rară a lui T poate forma pereche cu forma ceto normală a lui G, fără ca perechea anormală T—G să poată fi deosebită dimensional de perechea normală G—C.

Înalta fidelitate a replicării este însă condiționată și de activitățile exonucleazice 3′→5′ ale ADN-polimerazei I, care corectează copierea matriței, eliminînd din catena nou sintetizată nucleotidele greșit împerecheate cu matrița. Cînd polimeraza nu poate extinde polimerizarea la nivelul unui terminus greșit împerecheat, al catenei nou sintetizate, intervine activitatea sa exonucleazică care îl scoate, lăsînd situl liber pentru un dNTP corespunzător. Este deci vorba despre un dublu mecanism de corecție care asigură marea fidelitate

Scanned with OKEN Scanner

a replicării : corecția capătului primer (cînd nu există o corectă împerechere matriță-primer în capătul 3′-OH al primerului, acesta este excizat) și selecția corespunzătoare al unui nucleotid în vederea polimerizării. Este deci vorba de existența unui fel de autocontrol la nivel molecular exercitat în activitatea ADN-polimerazei.

Se mai descrie și o activitate exonucleazică 5′→3′ care disociază preferențial ARN în hibrizii ADN—ARN ca și ADN care include în secvența sa uracilul, excizînd specific perechile A—U, ducînd la acumularea de mono- și oligonucleotide. Catena polipeptidică a ADN-polimerazei este disociată prin proteoliză în două fragmente, unul mare (GM = 76 000 daltoni) și altul mic (GM = 36 000 daltoni). Fragmentul mare prezintă activitate polimerazică 5′→3′. Cu toate acestea, în prezent metodele de separare sînt încă imperfecte, din care cauză este greu de stabilit cu certitudine dacă asemenea activități exonucleazice sînt intrinseci polimerazei sau reprezintă contaminanți moleculari.

15. **Replicarea discontinuă (segmentară) a ADN (modelul Okazaki).** Modelul semiconservativ de replicare implică apariția în timpul desfășurării procesului a bifurcației de replicare de forma literei Y. Această structură a ADN în replicare, enunțată ipotetic de Watson și Crick, a fost evidențiată electronomicroscopic și autoradiografic la bacterii (Cairns, 1963), ca și la alte sisteme biologice. Caracteristic pentru ADN-polimeraza III, enzimă esențială în replicare, este faptul că ea prezintă specificitate de direcție, nu însă și de secvență, ea copiind matrița prin deplasare doar în direcția 3′→5′ pe ambele catene matriță. sinteza noilor catene (replicilor) avînd loc numai în direcția 5′→3′. Bifurcația de replicare și polaritatea inversă a catenelor matriță ar implica ca ADN-polimeraza de replicare să determine sinteza pe o catenă în direcția 3′→5′, iar pe cealaltă catenă în direcția 5′→3′. Pînă în prezent însă nu a fost descoperită vreo ADN-polimerază care să meargă pe catena matriță în direcția 5′→3′ și să polimerizeze nucleotidele în direcția 3′→5′, iar modelul lui Kornberg nu a putut explica și acest aspect în cadrul unei replicări simultane pe cele două matrițe antiparalele. O soluție la această aparentă dilemă, și care explică faptul că sinteza ADN se desfășoară secvențial dintr-o origine unică pe ambele catene matriță și că replicarea are loc numai în direcția 5′→3′ a fost oferită de Okazaki și colab. (1968, 1971) : ei au admis că sinteza ADN este de fapt un proces discontinuu, în sensul că cel puțin una dintre cele două catene replică este sintetizată sub forma unor mici fragmente (fragmente Okazaki) care sînt ulterior unite de către ADN-ligază. ADN-polimeraza III sintetizează discontinuu mici fragmente iar ADN-ligaza le unește covalent spre a forma o catenă unică. Datele actuale sugerează că sinteza ambelor catene noi este discontinuă iar modelul Okazaki este aplicabil tuturor sistemelor

Scanned with OKEN Scanner

biologice. În cadrul acestui model polimeraza merge numai în direcția 3′→5′, pe ambele matrițe, sărind, la nivelul bifurcației, de pe o catenă-matriță și întorcîndu-se înapoi pe cealaltă catenă-matriță sintetizînd segmentar noile catene (replicile) cu formarea de fragmente Okazaki. Catena nou sintetizată se continuă de pe o matriță pe cealaltă, la nivelul bifurcației de replicare printr-o legătură covalentă fosfodiesterică. Este necesară, în consecință, intervenția unei endonucleaze care determină în replică o incizie monocatenară, făcînd astfel posibilă atașarea la ea a unei noi molecule de polimerază care repetă ciclul de replicare cu saltul său de pe o catenă pe alta și cu sinteza de fragmente Okazaki, adică cu replicarea pe segmente a ADN (fig. 15).

Fragmentele Okazaki au fost evidențiate în urma unui marcaj pulsatoriu (0,02—2% din timpul de generație) cu ^{3}H-timidină a ADN nou sintetizat (în celule ce cresc foarte încet la 20 °C, avînd timpul de generație de multe ore) urmat de denaturarea, ultracentrifugarea și separarea catenelor sale în gradienți de sucroză, sau cromatografie pe coloană cu hidroxiapatită sau nitroceluloză. Catenele marcate, deci nou sintetizate, apar ca fragmente mici, monocatenare, avînd constanta de sedimentare 4—10 S, corespunzînd la 1000—2000 nucleotide. Dacă timpul de marcare pulsatorie este mai îndelungat, aceste

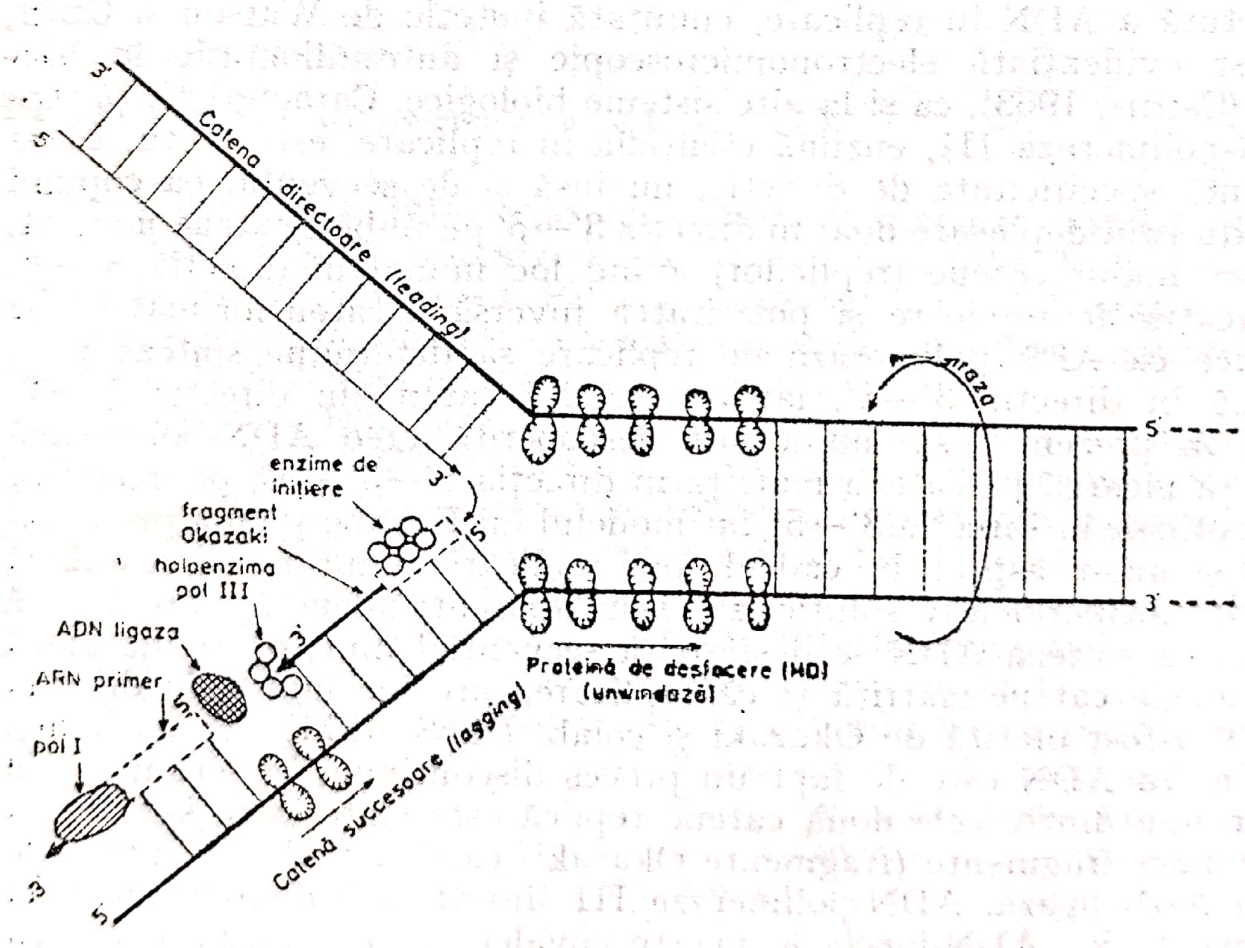


Fig. 15. Schema generală a procesului de sinteză discontinuă la nivelul bifurcației de replicare în care este reprezentat și aparatul enzimatic al replicării.

Scanned with OKEN Scanner

fragmente apar dublu-catenare și cu greutate moleculară mai mare. Astfel, toate fragmentele Okazaki sintetizate pe o catenă matriță cresc în aceeași direcție cu mișcarea generală de deplasare a bifurcației de replicare, pe cînd fragmentele Okazaki de pe catena matriță complementară cresc în direcție opusă direcției de deplasare a bifurcației de replicare. Toate aceste fragmente Okazaki sînt însă sintetizate în același sens, adică de la 5′ spre 3′, ADN-polimeraza III deplasîndu-se în aceeași direcție (de la 3′ spre 5′) pe ambele catene matriță.

Pe această bază s-a tras concluzia că alungirea catenei nou sintetizate este discontinuă și se realizează printr-o serie de reacții de polimerizare desfășurate simultan din diferite puncte. În acest fel rata de sinteză a ADN crește fără a fi necesară creșterea vitezei de deplasare a bifurcației de replicare. Creșterea catenei în direcția 5′→3′ este asigurată de activitatea specifică a polimerazei (care se deplasează numai în direcția 3′→5′) asupra capătului 3′→OH al primerului și asupra dezoxiribonucleozidtrifosfatului cu formarea legăturii fosfodiesterice, primerul fiind un component obligatoriu al sistemului replicativ care inițiază (primează) sinteza fragmentelor Okazaki, deoarece toate ADN-polimerazele cunoscute au capacitatea numai de a extinde catene polinucleotidice deja existente, nu însă și de a iniția asemenea catene (Bollum, 1963). Grupul 3′-OH poate fi oferit de capătul unei crestături monocatenare introduse în structura bicatenară de către o endonuclează așa cum se întîmplă la nivelul bifurcației de replicare. Dar această extremitate 3′-OH a crestăturii monocatenare este folosită ca primer în sinteza de reparare. În replicare însă, este necesar un mic fragment de ARN de cel puțin 10 ribonucleotide (de regulă însă are 50—100 nucleotide) care îndeplinește funcția de primer. Rolul ARN ca primer al replicării ADN a fost descoperit prima dată de către K. G. Lark, studiind replicarea cromozomului bacterian la *E. coli*, și demonstrat în cazul replicării ADN de fag M_{13} la care monocatena plus a fagului infectant nu este convertită în forma replicativă bicatenară (RF) neputîndu-se sintetiza replica sa — catena minus, în prezența rifampicinei, inhibitor al ARN-polimerazei. Această conversie are însă loc în prezența cloramfenicolului — inhibitor al sintezei proteinice. La fagul φX 174 s-a constatat însă că replicarea catenei parentale plus în celula gazdă de *E. coli* are loc în prezența rifampicinei, ceea ce înseamnă că, în acest caz, sinteza primerului ARN este catalizată de o ARN-polimerază rezistentă la rifampicină. Că și în acest caz are loc sinteza unui ARN primer este demonstrat de faptul că scoaterea ribonucleozidtrifosfaților din amestecul de reacție *in vitro* împiedică formarea RF de φX 174. Inițierea replicării cromozomului de *E. coli* este dependentă de produsul genei dna C, desfășurarea replicării fiind totodată dependentă de produșii genelor dna B și dna G. S-a dovedit că produsul genei dna G este de fapt ARN-polimeraza rezistentă la ri-

Scanned with OKEN Scanner

fampicină, ea catalizînd asamblarea ribonucleozidtrifosfaţilor în ARN primer. Acest produs al genei dna G este necesar în tot cursul replicării, căci fiecare segment Okazaki este iniţiat de un primer ARN.

În procesul de iniţiere a replicării, imediat după ce endonucleaza introduce incizia monocatenară, la nivelul acestei incizii pătrunde enzima ARN-polimerază care are proprietatea de a polimeriza ribonucleotide fără a depinde de un primer, interacţionînd cu un oarecare factor de replicare, devenind astfel rezistentă la rifampicină. ARN-polimeraza catalizează deci sinteza ARN primer. După sinteza ARN primer, ARN-polimeraza iese, iar energia eliberată la nivelul inciziei determină desfacerea a încă a 2—3 punţi de hidrogen de o parte şi de alta a acesteia, permiţînd ataşarea ADN-polimerazei cu situl pentru matriţă pe catena intactă şi cu situl pentru primer pe capătul 3′—OH al ARN primer. Prima legătură fosfodiesterică se realizează între 3′—OH primerului şi 5′-fosfatul primului dezoxiribonucleotid aliniat pe matriţă, astfel că primerul este încorporat în fragmentul Okazaki şi poate fi excizat numai prin acţiunea exonucleazică a ADN-polimerazei I, după ce sinteza acestuia este completă. După primare (iniţierea sau formarea primei legături fosfodiesterice) următoarele legături fosfodiesterice (elongaţia) se vor forma între 3′—OH al capătului catenei în creştere şi 5′-fosfatul nucleotidelor ce se aliniază succesiv pe matriţă. Catena nou sintetizată al cărei capăt este extins poartă din această cauză numele de ADN primer. Ea este antiparalelă matriţei. Se realizează polimerizarea nucleotidelor într-un sistem de matriţă-primer în care intervin şi enzimele destabilizatoare corespunzătoare, realizîndu-se astfel elongaţia catenei. Incorporarea succesivă de nucleotide (elongaţia catenei) este de fiecare dată precedată de desfăşurarea catenei libere (care la început nu funcţionează ca matriţă) şi împingerea sa în citoplasma înconjurătoare în cazul procariotelor sau în nucleosol în cazul eucariotelor. La o distanţă oarecare, delimitată probabil de un prag mecanic de desfăşurare a catenelor dublei elice, polimeraza sare de pe o catenă pe cealaltă pe care o foloseşte ca matriţă şi o copiază. Evenimentele de iniţiere şi elongaţie sînt repetate pînă ce este copiată întreaga moleculă parentală de ADN, pe ambele catene, rezultînd două molecule fiice identice de ADN.

Fragmentele Okazaki născînde conţin ARN primer covalent legat la capătul 5′-fosfat (Lark, 1972 ; Sugino şi colab., 1972 ; Reichard şi colab., 1974). La nivelul joncţiunii ARN—ADN se află la majoritatea sistemelor cercetate, dar nu la toate, o structură unică :

p (rPi)p (rA) p (rU sau rC) p (dC)p care ar servi ca semnal pentru terminarea sintezei ARN şi iniţierea sintezei ADN (fig. 16). Segmentul ARN primer este înlăturat din fragmentul Okazaki prin activitatea exonucleazică 5′→3′ a ADN-polimerazei I, care astfel intervine într-o etapă mai tîrzie a replicării, golul rămas fiind completat tot

Scanned with OKEN Scanner

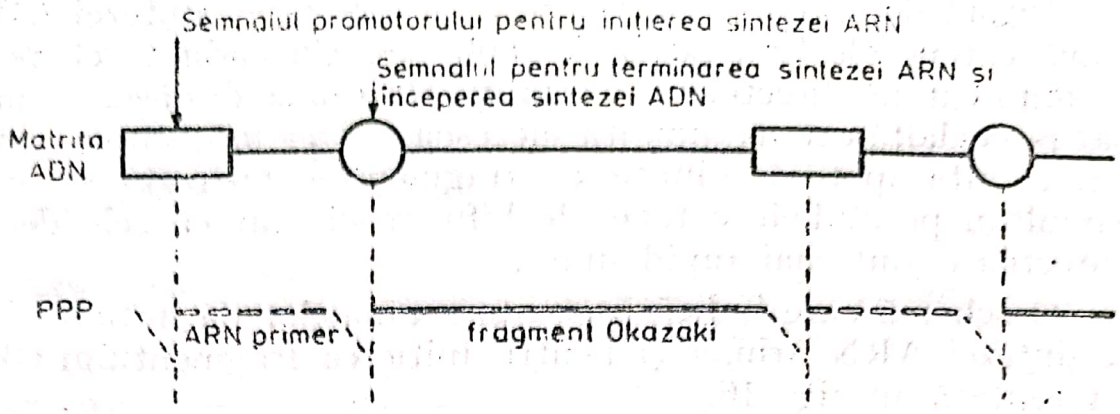


Fig. 16. Schema semnalelor de inițiere și terminare a sintezei ARN primer și de inițiere a sintezei fragmentului Okazaki.

de către această enzimă, iar ADN-ligaza unește fragmentele Okazaki în catene mai lungi.

La mutanții *„dut"* de *E. coli* (deficienți în *UTP*-ază) are loc încorporarea dUTP în ADN. Acest lucru se poate realiza și prin dezaminarea spontană cu o rată apreciabilă chiar în condiții fiziologice a citozinei din ADN, cu transformarea ei în uracil și cu apariția unei mutații de tranziție. Printr-un sistem de excizie-reparare (bazat pe activitatea exonucleazică a ADN-polimerazei I și recunoașterea lui U prin faptul că spre deosebire de T acesta nu are grupul 5-metil în inelul pirimidinic, fiind ușor distins de către enzimele de reparare) are loc excizia uracilului din ADN, formîndu-se fragmente scurte de tip Okazaki. Aceasta ar fi o alternativă la formarea de fragmente Okazaki primate cu ARN (Bik-Kwoon-Tye și colab., 1977). Același aspect este întîlnit și la tulpinile de *E. coli*, cu mutație în locusul Sof (dna S) deficiente de dUTP-ază (dezoxiuridintrifosfat-difosfohidrolază), enzimă ce hidrolizează dUTP în dUMP și PP. Aceste tulpini prezintă o mare frecvență de recombinare și încorporează precursorii radioactivi în fragmente mici de ADN, 4—5 S. Reversia sof^- în sof^+ restaurează activitatea UTP-azei și înlătură acumularea fragmentelor 4—5. S. Deși dUTP este precursorul normal al dTTP și poate fi eficient încorporat în ADN de către ADN-polimeraze, în mod normal uracilul nu se găsește în ADN, deoarece UTP-aza previne această includere, hidrolizînd dUTP în dUMP care reprezintă un precursor al sintezei de novo a dTTP. Resturile uracil ce scapă acțiunii dUTP-azei și sînt greșit încorporate în ADN sînt excizate prin sistemul de excizie sus-amintit urmat de o replicare reparatorie în care catena normală ce are resturi de acid guanilic este folosită ca matriță. Acest sistem de reparare cu funcție antimutațională, adaptativă, face ca în ADN să se afle T ca bază 6-aminopirimidinică. Pe această cale pot rezulta fragmente ADN de tip Okazaki.

Scanned with OKEN Scanner

Există două opinii privitoare la desfășurarea sintezei ADN pe cele două catene ale bifurcației de replicare. Una admite că pe o catenă, numită catenă directoare — *leading*, sinteza se desfășoară mai înainte, iar pe cealaltă catenă, numită succesoare (*lagging*), sinteza este întîrziată. O altă ipoteză admite că fragmentele Okazaki se sintetizează simultan pe ambele catene ale bifurcației, dar că cele de pe catena directoare sînt mai rapid unite.

O schemă care indică prezența semnalelor de inițiere și terminare a sintezei ARN primer și pentru inițierea fragmentului Okazaki este prezentată în fig. 16.

Între terminarea unui fragment Okazaki și inițierea sintezei fragmentului următor există o pauză, replicarea ADN fiind astfel discontinuă spațial sau, în unele cazuri spațio-temporal. Existența semnalelor pentru inițierea replicării recunoscute de către ARN polimerază, enzimă cu specificitate de secvență, este dovedită la mutanții condițional-letali de *E. coli* cu deficiențe în produșii genei pentru inițierea replicării. Prin integrarea ADN fagului P_2 în cromozomul unor asemenea mutanți, defectul este înlăturat (supresie de integrare) și începe replicarea cromozomului bacterian indiferent dacă situl în care a avut loc integrarea ADN fagic corespunde sau nu semnalului normal al inițierii replicării din cromozomul gazdă, acest ADN fagic avînd semnale normale proprii de inițiere a replicării. Dar, deși replicarea ADN fagic se face unidirecțional, integrat în cromozomul gazdă, va fi replicat bidirecțional. Datele biochimice și genetice privind replicarea ADN sînt încă insuficiente (tabelul nr. 4).

Tabelul 4

Evenimentele replicării și enzimele catalizatoare

Replicarea	Proteina de replicare
A. INIȚIEREA CROMOZOMULUI	
1. Atașarea la membrană	dna C
2. Derepresia sintezei proteinice	dna ?
3. Sinteza proteinelor de inițiere	—
4. Sinteza ARN	ARN-polimeraza clasică
5. Formarea bifurcației de replicare (o oarecare elongație)	?
6. Excizia ARN	?
B. ELONGAȚIA	
1. Despiralizarea	Proteina despiralizatoare de *E.coli*. Enzima rec BC(?)
a. Pivotul	Proteina omega

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 4 (continuare)

Replicarea	Proteina de replicare
2. Inițierea sintezei segmentului Okazaki	
a. formarea ARN primer	ARN-polimeraza neclasică (dna G) sau ARN-polimeraza clasică + + dna G.
3. Formarea segmentului Okazaki 10 S	
a. Formarea complexului Pol III*	
1. ATP-aza	dna B?
2. Copol III*	
3. ADN-polimeraza III	dna E
b. polimerizarea ADN	
1. Pol III*	dna E
C. TERMINALIZAREA	
1. Excizia ARN-primer	Exonucleaza 5'→3' a ADN-polimerazei I.
2. Închiderea golurilor dintre segmentele Okazaki	ADN-polimeraza I
3. Unirea fragmentelor ADN într-o catenă unică.	ADN-ligaza

16. Excepții de la replicarea semiconservativă obișnuită. Una dintre cele mai neașteptate descoperiri din istoria cercetării ADN-polimerazelor a fost realizarea unei sinteze de novo a unui polimer enorm poli d (A—T) în absența matriței-primer (Kornberg, 1974). Au fost sintetizați de novo și alți homo- și copolimeri cu ajutorul ADN-polimerazei I bacteriene. Dealtfel și plasmidele bacteriene sînt replicate de ADN-polimeraza I (vezi cap. XIII). Analiza ADN satelitic arată că el reprezintă repetiții simple de tipul homo- și copolimerilor (97% AT și 3% GC), ceea ce sugerează că pot fi sintetizate de novo printr-o reacție catalizată de ADN-polimerază, avînd loc o replicare repetată a oligomerilor bicatenari, o catenă a lor legîndu-se la situl pentru matriță iar cealaltă la situl primer. Asemenea ADN satelit cu 97% AT se pare că nu funcționează în transcriere, nefiind încă decelată o proteină copolimeră corespunzătoare de tip izoleucină — tirozină.

Date recente arată că ADN mitocondrial în unele cazuri se sintetizează după un model dispersiv (Gauze, 1977).

17. Replicarea la bacterii și bacteriofagi. 1. *Replicarea cromozomului bacterian.* Cromozomul bacterian reprezintă o dublă elice cir-

Scanned with OKEN Scanner

culară de ADN. Numai la *Pseudomonas* se pare că există un cromozom liniar.

La bacterii, ca dealtfel şi la celelalte procariote, replicarea începe într-un punct unic, bine determinat, care s-a numit originea replicării sau punct de iniţiere a replicării, şi se continuă pînă la un punct terminus, adiacent originii.

Cromozomul procariot apare ca o unitate autonomă de replicare numită replicon (Jacob şi Brenner, 1963), capabil de a-şi autoregla propria sa replicare prin activitatea unui grup funcţional numit replicator. Replicatorul reprezintă un segment specific al repliconului. Replicarea este dirijată prin produsul difuzabil al unei gene numit iniţiator. Iniţiatorul interacţionează în mod specific cu replicatorul avînd loc iniţierea replicării într-un sit specific numit punct de iniţiere sau originea replicării la nivelul căruia se ataşează sistemul enzimatic al replicării de unde se deplasează de-a lungul structurii circulare pe măsură ce cromozomul bacterian se roteşte în jurul axei sale şi se desface. La punctul de iniţiere, replicatorul este ataşat de membrana celulară, sistemul enzimatic al replicării fiind cantonat în membrana celulară la situl de ataşare cromozomală şi rămîne fixat pe membrană, cromozomul deplasîndu-se pe el astfel că bifurcaţia de replicare rămîne permanent la situl de ataşare la membrană, iar mişcarea sa de-a lungul cromozomului rezultă din mişcarea cromozomului peste situl de ataşare.

Ataşarea iniţiatorului la membrana celulară prin intermediul mezozomului poate duce la iniţierea replicării. Iniţierea presupune sinteza unui sit de membrană pentru ataşarea ADN la nivelul unor secvenţe particulare ; apoi sinteza unor proteine de iniţiere desemnate I şi II şi sinteza ARN primer (Matsushita şi Kubitschek, 1975). Replicarea cromozomului de *E. coli* începe la nivelul genei pentru originea replicării, care a fost cartată lîngă genele care specifică sinteza izoleucinei (ilv) şi valinei (val). La nivelul secvenţei ADN, reprezentînd gena pentru originea replicării intervine o endonuclează (swivelază) care crestează una dintre cele două catene ale duplexului ADN, acesta desfăcîndu-şi ca urmare tururile superhelicoidale. Intervenţia unei unwindaze duce la denaturarea dublului helix, această enzimă legîndu-se preferenţial de ADN monocatenar la punctul de replicare, astfel că împiedică reunirea catenelor complementare parentale. Desfacerea duplexului ADN la nivelul originii replicării creează aşa-numita buclă sau ochi de replicare, la nivelul căruia pătrunde ARN-polimeraza dependentă de ADN care iniţiază sinteza unui segment de ARN primer. Iniţierea sintezei ARN primer poate avea loc la nivelul mai multor puncte ale ochiului de replicare.

După iniţiere, replicarea se desfăşoară secvenţial pînă ce întregul replicon este dedublat.

Scanned with OKEN Scanner

În procesul de replicare a ADN bacterian, respectiv în faza de alungire a catenei nou sintetizate, pe lîngă intervenţia enzimei ADN-polimeraza III, cu rol esenţial în reacţia de polimerizare, intervin şi alţi factori proteinici precum proteina specificată de gena dnaZ de *E. coli*, şi factorii de elongaţie ai catenei ADN desemnaţi I şi II (Wickner, 1976).

Terminalizarea replicării repliconului nu este în prezent explicată cauzal, dar ar putea fi implicat, cel puţin în parte, un mecanism analog iniţierii replicării.

Cromozomul bacterian şi viral, ca dealtfel şi plasmida bacteriană, sînt exemple tipice de repliconi. Ataşarea la membrană condiţionează în lipsa unui aparat mitotic segregarea ordonată a cromozomilor fii în celulele fiice. Ea se realizează prin intermediul unor structuri membranare — mezozomi (Ryter şi Jacob, 1963), descrişi şi la cianobacterii (Ionescu şi Zarnea, 1976; Gavrilă, 1976, Gavrilă, 1978, Gavrilă şi Tăcină, 1978). Ataşarea la membrana celulară a originii şi terminusului replicării, nu însă şi a bifurcaţiei de replicare, a fost demonstrată experimental. Astfel, markerul foarte timpuriu *ade 16*, situat adiacent originii, şi markerul foarte tîrziu *met*, situat lîngă terminusul replicării, se află cu o frecvenţă mult mai mare faţă de alţi markeri în complexele ADN-membrană, izolate din lizate celulare de *B. subtilis*.

Iniţierea replicării este dependentă de membrana celulară, situl vechi de ataşare la membrană a cromozomului controlînd iniţierea unei noi runde de replicare prin represarea formării unui nou sit, pînă ce membrana nou sintetizată nu înlătură această represie, astfel că timpul de iniţiere a replicării este determinat de viteza de creştere a membranei celulare între cele două situri de ataşare, vechi şi nou, care astfel sînt îndepărtate avînd loc şi separarea cromozomilor fii (fig. 17). După ce replicarea se termină, cromozomii fii sînt eliberaţi de pe mezozom.

Încheierea formării septului transversal care duce la separarea celulelor fiice este semnalul pentru un nou ciclu de replicare. La mutanţii la care replicarea ADN nu este coordonată cu formarea septului, apar celule fără ADN, care nu sînt viabile. Cînd are loc replicarea ADN urmată de diviziunea nucleoidului, dar nu şi de formarea septului, rezultă celule filamentoase extrem de lungi, multinucleoide.

După încheierea unui ciclu de replicare se formează un nou sit de ataşare la membrana celulară, adiacent celui vechi. Un capăt liber al catenei nou sintetizate se ataşează la acest nou sit de membrană şi se reiau evenimentele replicării.

Implicarea membranei celulare în iniţierea replicării este dovedită de faptul că mutaţia care afectează gena dna A (legată de iniţierea replicării cromozomului) determină totodată alterări în proteinele de membrană (Ryter şi colab., 1969; Shapiro şi colab., 1970).

Scanned with OKEN Scanner

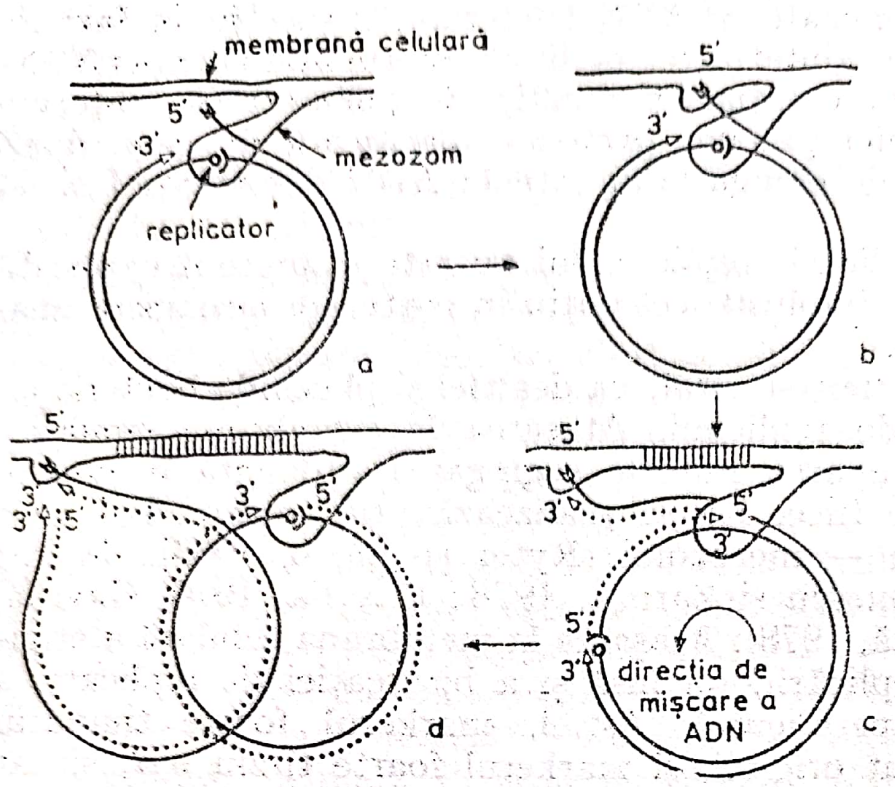


Fig. 17. **Replicarea cromozomului bacterian după modelul Jacob—Brenner:** a = cromozomul atașat la mezozom la situl replicator care servește ca pivot. O catenă este ruptă; b = capătul 5′ al catenei rupte se atașează la un nou sit pe membrană; c = cromozomul se rotește în sens invers acelor de ceasornic; d = separarea cromozomilor fii prin creșterea membranei celulare.

Inițierea replicării întregului cromozom bacterian nu trebuie confundată cu inițierea sintezei fragmentelor Okazaki. Inițierea replicării întregului cromozom (repliconului) are loc o singură dată în cadrul fiecărui ciclu celular, pe cînd fragmentele Okazaki sînt inițiate de nenumărate ori, în funcție de lungimea cromozomului, de-a lungul acestuia fiind mai multe puncte de inițiere pentru fragmentele Okazaki. Și controlul genetic al acestor două procese este diferit. Astfel, la *E. coli*, pe cînd produsul genei dna G este responsabil pentru inițierea fragmentelor Okazaki, cei ai genelor dna A și dna C sînt responsabili pentru inițierea replicării cromozomului.

Cromozomul de *E. coli*, aflat în replicare, prezintă trei părți dispuse într-o configurație ce amintește de litera grecească θ (theta), numindu-se chiar structură theta sau structură Cairns. Ea caracterizează și alte structuri circulare ADN aflate în replicare. Alungirea catenei ADN în procesul replicării cade sub incidența acțiunii produșilor genelor dna B, dna D, dna F, dna G și dna Z.

Replicarea structurilor circulare presupune realizarea unei incizii monocatenare la nivelul sitului replicator în vederea desfășurării lor, puntea fosfodiesterică rămasă intactă a celeilalte catene servind ca pivot care permite rotația și desfășurarea structurii circulare. Este posibil ca inițierea replicării să se bazeze și pe existența unei secvențe specifice de baze, fără a fi necesară o crestătură monocatenară sau un capăt cromozomal.

Începînd de la origine, replicarea se desfășoară secvențial pînă la terminus cu replicarea simultană a ambelor catene, fapt care deter-

Scanned with OKEN Scanner

mină apariția bifurcației de replicare. Catena matriță rămîne circular închisă pe cînd catena nou sintetizată este circular deschisă. Bifurcația de replicare „se mișcă" de-a lungul dublului helix parental ADN cu circa 1000 nucleotide /s.

Demonstrarea faptului că replicarea este realizată secvențial și nu într-o ordine întîmplătoare a fost făcută de către Yoshikawa și Sueoka (1963 a, b; Yoshikawa și colab., 1964), care au arătat că frecvența unui marker genic aflat în apropierea originii replicării este dublă față de aceea a unui marker genic aflat lîngă punctul terminus al replicării. Markerul genic din apropierea originii replicării există la nivelul celor două duble elice născînde, pe cînd cel de lîngă terminus există doar la nivelul dublei elice parentale.

Totodată s-a stabilit că originea (inițierea) replicării este fixă de-a lungul generațiilor celulare la *E. coli*, rămînînd în apropierea genei ilv iar la *B. subtilis*, lîngă gena ade 16. Dată fiind circularitatea cromozomului bacterian, deplasarea bifurcației de replicare se poate realiza într-o singură direcție (replicare unidirecțională) sau în ambele direcții (replicare bidirecțională) (Master și Broda, 1971; Gyurasits și Wake, 1973). Viteza de sinteză a ADN la nivelul unei bifurcații este totdeauna constantă, indiferent de rata de creștere a celulei. Rata de creștere a celulei și implicit de sinteză a ADN se dublează, nu prin accelerarea vitezei de deplasare a bifurcației, ci prin dublarea frecvenței de inițiere a replicării (formarea bifurcației de replicare). Cînd există două puncte (două bifurcații de replicare ce se deplasează în direcții opuse (bidirecțional), acestea pot fi vizualizate la microscopul electronic ca doi ochi. În prezent nu se știe dacă viteza de mișcare a bifurcației de replicare este aceeași în ambele direcții. Replicarea bidirecțională este mai frecventă decît aceea unidirecțională.

Replicarea bidirecțională este dovedită autoradiografic (originea și terminusul nu apar contiguu marcate, fiind separate în regiuni cu polarizări opuse la nivelul cărora apare o înaltă densitate a grăunurilor) și prin analiza frecvenței mutațiilor cu nitrozoguanidina care acționează preferențial la nivelul bifurcației de replicare: frecvența mutației unor markeri cunoscuți corespunde la două direcții de replicare ce pornesc dintr-o origine comună.

Cînd noi runde de replicare sînt inițiate mai înainte ca ciclul precedent să se fi terminat apare o replicare dicotomică cu multiple bifurcații de replicare (fig. 20), frecvența genelor localizate, în apropierea originii replicării fiind de 4 ori mai mare față de frecvența celor din apropierea terminusului, atunci cînd se analizează culturi sincrone de *B. subtilis* cu creștere rapidă. Pot exista pînă la 15 asemenea bifurcații de replicare pe cromozom. Replicarea cu multiple bifurcații a fost demonstrată la *E. coli*, la care s-a remarcat creșterea bruscă a ratei de mutație indusă cu nitrozoguanidină și dublarea ratei de

Scanned with OKEN Scanner

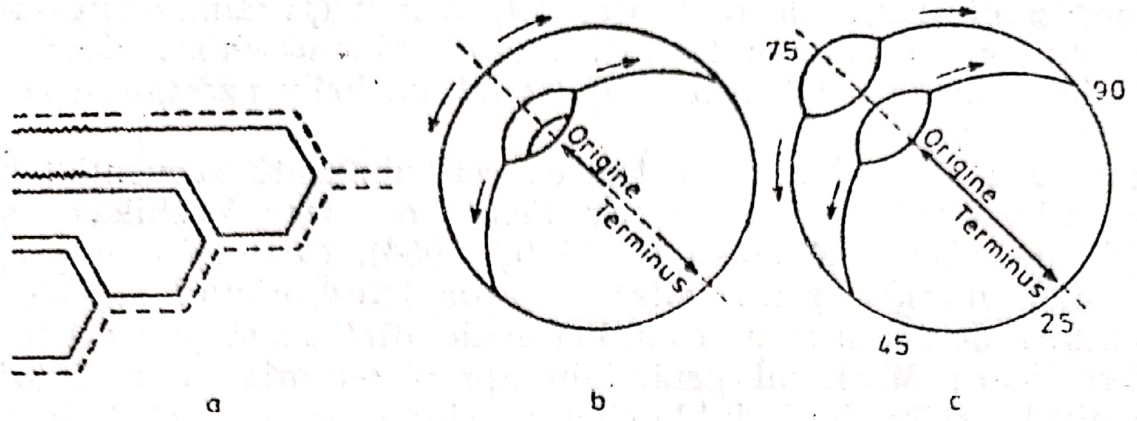
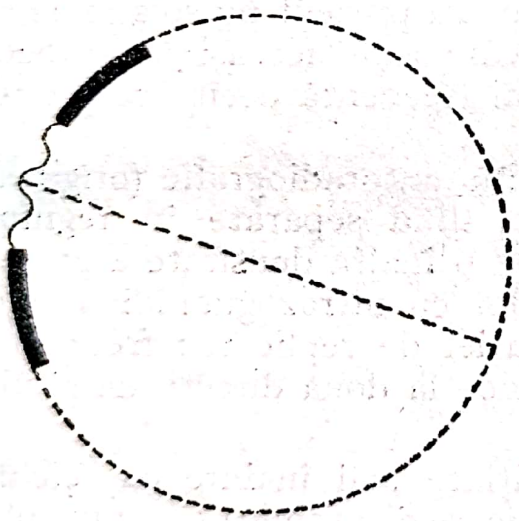


Fig. 18. **Reprezentarea replicării dicotomice asimetrice** într-un sistem liniar (a) şi circular (b), precum şi a replicării simetrice cu multiple bifurcaţii (c).

sinteză a ADN chiar atunci cînd nu a fost parcurs decît jumătate din ciclul celular. Bifurcaţiile multiple permit diferitelor segmente ale genomului să fie replicate simultan, reducînd timpul de generaţie de la 40 min — cît este necesar unei bifurcaţii să traverseze întregul genom — la 20 min şi chiar mai puţin. Replicarea dicotomică poate fi simetrică sau asimetrică (fig. 18—21). În culturi de *E. coli* cu creştere exponenţială, ca şi în culturi sincrone de *B. subtilis*, modul normal de replicare este cel simetric (replicarea ambelor catene la nivelul bifurcaţiei). Acest tip de replicare a fost demonstrat prin marcaj



Legendă
ADN marcat radioactiv
ADN nemarcat
Diametrul împarte cromozomul în două jumătăţi; capătul stînga sus reprezintă originea replicării, iar capătul dreapta jos, terminusul acesteia

Fig. 19. Demonstrarea replicării bidirecţionale

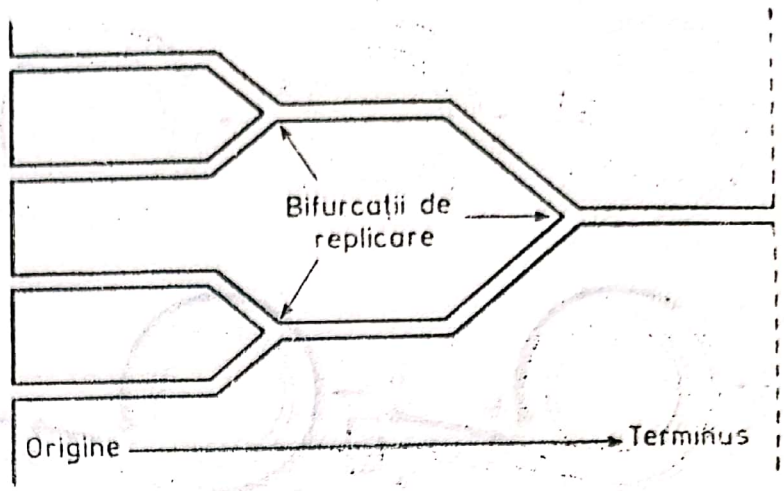


Fig. 20. **Reprezentarea liniară a replicării dicotomice (cu multiple bifurcații de replicare) și simetrice** (fig. 16—22, după Matsushita și Kubitschek, 1975).

izotopic și radioactiv — pulsatoriu, acesta din urmă fiind asociat ADN H—L (H-catenă grea, L-catenă ușoară), nu și ADN H—H, cum se întîmpă într-o replicare asimetrică, în care numai una dintre dublu-helixurile fiice inițiază un al doilea ciclu de replicare. Replicarea asimetrică apare în culturi nestaționare sau în condiții vitrege (carență de aminoacizi sau timină), ca dealtfel și în timpul conjugării bacteriene, cînd o singură catenă de ADN donor este trecută în celula receptoare pe măsură ce o nouă catenă este sintetizată (replicare asimetrică), refăcîndu-se astfel structura normală bicatenară a donorului.

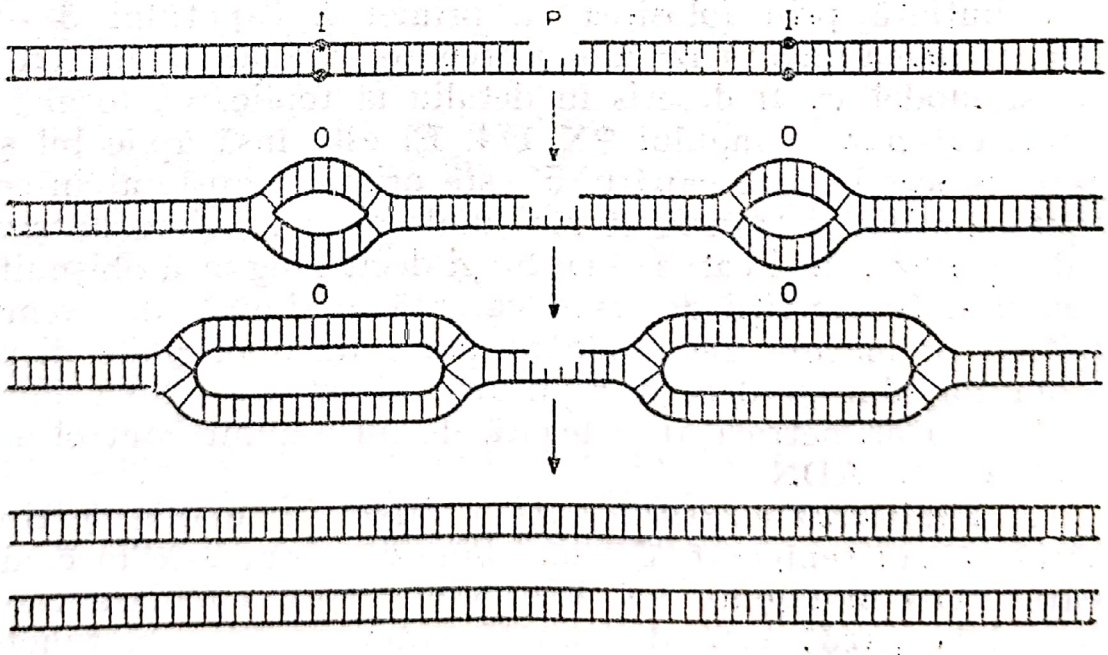


Fig. 21. Reprezentarea schematică a replicării bidirecționale într-o moleculă liniară de ADN: I — punct de inițiere a replicării; P — pivot; O — ochi de replicare

Scanned with OKEN Scanner

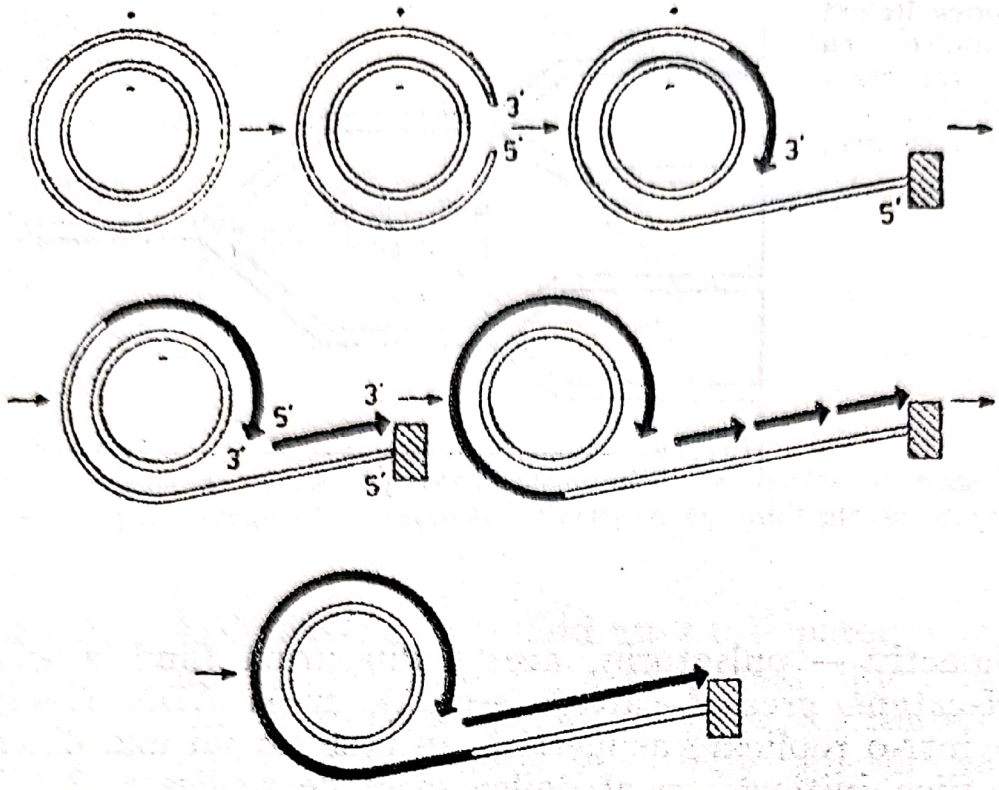


Fig. 22. **Modelul inelului rotativ de replicare a structurilor circulare ADN.** În conjugarea bacteriană capătul 5′ nu se mai prinde de membrană, ci migrează prin puntea de conjugare în celula acceptoare.

Tot o replicare asimetrică apare și în cadrul modelului inelului rotativ (fig. 22) propus de către Gilbert și Dressler (1968) pentru explicarea replicării ADN circular bicatenar, model care reprezintă o alternativă la modelul bifurcației de replicare și în care replicarea este inițiată prin folosirea ca primer a capătului 3′—OH (expus liber în urma unei incizii monocatenare) și a catenei intacte ca matriță. Acest model va fi descris în detaliu la replicarea formei replicative dublu-catenare a fagului φX 174. El este însă aplicabil și în conjugare, proces în care capătul 5′ este primul transferat în celula receptoare, putînd fi transferat mai mult de o lungime de cromozom pe calea sintezei unei catene mai lungi decît lungimea obișnuită a cromozomului. În condiții de stres (carență în timină, de exemplu) au loc inițieri premature ale replicării unora dintre originile disponibile ale cromozomului și deci o replicare asimetrică. După unele ipoteze, replicarea asimetrică ar fi legată de un anumit control al vitezei de replicare a ADN.

2. *Replicarea virusurilor ADN* diferă în funcție de tipul de virus, virulent sau temperat. Cel mai bine cunoscut este mecanismul replicării ADN al fagului φX 174. Monocatena circulară care pătrunde în celula gazdă este desemnată catena „+". Ea funcționează ca matriță pentru sinteza unei catene complementare „—" sub cataliza polimerazei celulei gazdă *E. coli*. Cele două catene rămîn asociate

formîndu-se o structură superelicoidală, covalent închisă, reprezentînd forma replicativă parentală (RF I). Ea suferă apoi numeroase runde de replicare semiconservativă sub acțiunea unor fracțiuni enzimatice din celulele infectate cu fag (Eisenberg și colab., 1976). Proteina specificată de gena A de fag convertește forma replicativă RF I în forma relaxată RF II în urma crestării monocatenare la nivelul secvenței capătului 3′—T G C T C C C C A A C T T G_{OH}, secvență care reprezintă originea replicării (Langeveld și colab., 1978) în cadrul mecanismului inelului rotativ. În cadrul acestui model, în vederea replicării, molecula circulară suferă o tăietură monocatenară prin acțiunea unei endonucleaze, formîndu-se capete libere 3′—OH și 5′-fosfat. Capătul 5′ al catenei crestate (în cazul fagului φX174 este vorba de catena „+") se derulează liber, prinzîndu-se de membrana celulară a celulei gazdă, pe cînd capătul 3′—OH funcționează ca primer, alungindu-se, catena „—" rămînînd covalent închisă și funcțională ca matriță, pe care se desfășoară numeroase runde de replicare. Se sintetizează astfel noi catene „+" ce vor constitui miezul de acid nucleic al noilor particule fagice. Trecerea din forma inelară în cea lineară a catenei libere este însoțită de rotirea matriței dublu-catenare în jurul axei sale, de unde denumirea de inel rotativ, forma circulară fiind menținută de catena „—" rămasă intactă.

Cînd și la nivelul celei de a doua catene apare o crestătură monocatenară rezultă cunoscuta figură de replicare theta. Dezangajarea duplexului nou format de forma replicativă parentală se realizează prin intervenția endonucleazelor ce introduc crestături monocatenare la nivelul unor anumite secvențe.

Catenele „+" pe măsură ce sînt sintetizate se asociază cu o proteină fagică ce prezintă o mare afinitate pentru secvența lor, așa încît ele nu mai pot funcționa ca matriță pentru sinteza de noi catene „—" cu formarea de forme replicative bicatenare. Secvența originii replicării este unică și corespunde nucleotidelor 4 283—4297. Crestătura este plasată la începutul unei regiuni bogate în A—T cu palindromul TATTAATA flancat de o secvență bogată în G—C. Și la alte structuri genetice (ADN SV40 și polioma, ca dealtfel și unele plasmide) originea replicării conține o secvență bogată în A—T în interiorul unui segment bogat în G—C. Rezultă astfel circa 15 molecule fiice dublu-catenare, reprezentînd forme replicative fiice. Are loc apoi o replicare asimetrică a formei replicative în care doar catena „—" funcționează ca matriță pentru sinteza de noi catene complementare „+" care vor fi asamblate în particule virale progene.

Catena „+" inițială funcționează o singură dată ca matriță pentru sinteza unei catene „—", pe cînd catena „—" este folosită de nenumărate ori ca matriță.

În replicarea ADN circular monocatenar de φX 174 sînt necesare patru proteine: proteina genei A, indusă de fag, proteina gazdă rep,

Scanned with OKEN Scanner

holoenzima ADN-polimerază III şi proteina destabilizatoare — unwindază (Mitra şi colab., 1967; Scott şi colab., 1977). În prezenţa Mg^2, proteina A taie forma replicativă oferind un capăt primer pentru polimerază iar rep, în prezenţa ATP şi Mg^2 realizează separarea catenelor cu ataşarea proteinei destabilizatoare la monocatene, această proteină rep „topind" enzimatic duplexul fagic replicativ la nivelul bifurcaţiei de replicare, fiind dependentă de ATP şi separînd catenele în timpul deplasării bifurcaţiei în procesul replicării. Proteina A poate funcţiona şi ca ligază formînd o punte covalentă cu capătul 5′ al catenei tăiate „+".

Recent a fost elaborat un model (fig. 23) pentru replicarea ADN monocatenar al unor bacteriofagi, care presupune participarea a numeroase proteine în formarea formei replicative dublu-catenare (Schekman şi colab., 1974).

În prima etapă, preiniţierea, proteina de destabilizare (unwindaza) se leagă de ADN monocatenar. Are loc apoi iniţierea. ARN-polimeraza este ataşată la o regiune neexpusă a ADN, probabil regiunea specifică a originii, transcriind un segment mic de ARN care serveşte ca primer. Elongaţia catenei este realizată de către holoenzima ADN-polimerazei III prin adăugarea de dezoxiribonucleotide la capătul 3′—OH al primerului. Terminarea implică excizia primerului ARN prin activitatea exonucleazică a ADN-polimerazei I, umplerea golului de către ADN-polimeraza I şi unirea 5′ fosfat cu 3′—OH de către ADN-ligază.

Replicarea ADN de T_4 după modelul inelului rotativ duce la formarea unor molecule foarte lungi de ADN ce pot prezenta superspiralizări în cadrul unor structuri terţiare concatenate (concatemere). Ulterior, prin scindarea acestora, derivă molecule de ADN cu lungime specifică pentru acest fag. Se pare că forţe mecanice delimitează lungimea moleculelor fiice de ADN. Astfel, aceste molecule se „înghesuie" în capsidă pînă la refuz (modelul capului umplut), moment în care molecula lungă de ADN este tăiată enzimatic. Dar moleculele ADN fagic rezultate prezintă repetiţii terminale permutante de tip ABCDEFGAB BCDEFGABC CDEFGABCD, DEFGABCDE etc.

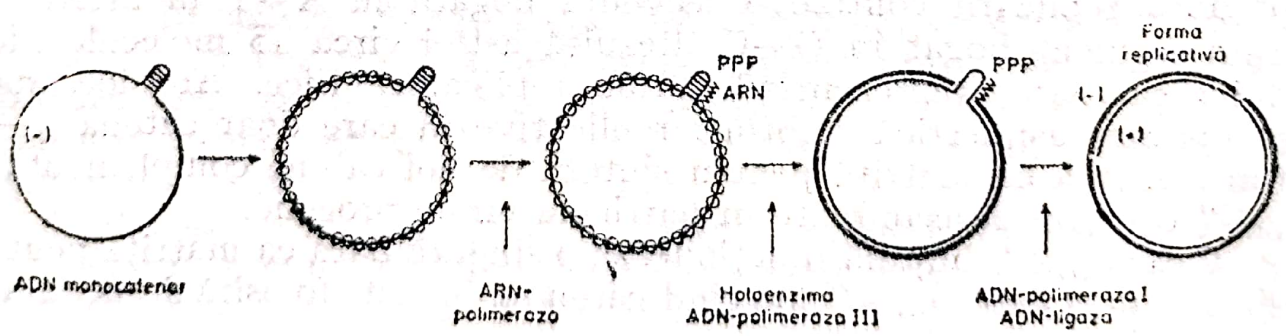


Fig. 23. Replicarea ADN monocatenar al bacteriofagului M—13: + catena parentală matriţă; „—" catena complementară-replică (după Schekman şi colab., 1974, din Sokotch şi Ferrentti, 1976).

Scanned with OKEN Scanner

La fagii temperați cel mai bine studiată este replicarea fagului λ. El se poate replica independent de cromozomul gazdă (ciclul litic) sau integrat ca profag în acesta la nivelul unor situri specifice (ciclul lizogenic). La începutul ciclului litic, cromozomul circular λ este replicat asemănător cromozomului bacterian gazdă, replicarea începînd dintr-un sit fix de inițiere de unde bifurcația de replicare pornește în două direcții opuse (replicare bidirecțională). Spre sfîrșitul procesului de replicare, aceasta se desfășoară după mecanismul inelului rotativ.

Fagul λ a elaborat circuite de control care decid care tip de replicare este cel mai eficient la un moment dat (Skalka, 1977). Aceste circuite sînt legate de modularea nivelelor de represor λ CI. În dezvoltarea litică, programul de replicare depinde de transcrierea ADN fagic cu sinteza proteinelor O și P codificate de ADN fagic iar proteina Gam joacă rol decisiv în inițierea replicării. Inițierea replicării necesită o „activare" mediată de transcriere a sitului de origine, primele dezoxiribonucleotide polimerizate fiind alineate la o mică moleculă de ARN primer. Transcrierea timpurie este condiționată de represorul λ CI care se leagă la operatorii O_L și O_R ce flanchează gena CI și în absența sa, ARN-polimeraza gazdă inițiază transcrierea la P_L și P_R. Transcrierea imediat timpurie este terminată prin intervenția factorului proteinic rho gazdă. Mai este o transcriere timpurie întîrziată și o transcriere tîrzie. Transcrierea timpurie întîrziată coincide cu replicarea ADN λ, cu formarea a două molecule circulare fiice, iar transcrierea tîrzie coincide cu replicarea după tipul inelului rotativ. Controlul transcripțional reglează și programul de replicare.

Inițierea replicării este dependentă și de funcționarea genelor dna E (Pol III), dna B (specifică o ribonucleozidtrifosfatază stimulată de ADN), dna G (polimerază ribonucleotidică) și dna Z, gene a căror funcționare condiționează (alături de genele dna A și dna C) și replicarea cromozomului de *E. coli*. Se admite că proteinele fagice O și P suplinesc produșii genelor dna A și dna C în replicarea ADN λ. În replicarea λ au mai fost implicate de asemenea trei noi funcții bacteriene, grp C, D și E, dintre care grp C (dna K) este cerută și de replicarea cromozomului gazdă ca și pentru replicarea lui φX 174. Genele fagice esențiale în replicarea ADN λ sînt N, O și P, căci replicarea ADN in situ poate avea loc chiar dacă toate genele din afara regiunii N—P sînt deletate. Studii de microscopie electronică arată prezența în ADN circular de λ a unor bucle numite „bucle D" care conțin o monocatenă și un braț egal cu structură bicatenară. S-a propus un model în care bifurcațiile în creștere se mișcă prin duplicarea uneia dintre catene (catena directoare *forward*) pe o distanță fixă care definește unitatea de replicare. Sinteza catenei „reversă" este inițiată la terminusul fiecărei unități de replicare *forward*). Lungimea unității de replicare este de 0,15—0,59 μm, existînd circa

Scanned with OKEN Scanner

50 asemenea unități pe cromozomul λ. ADN λ se atașează la membrană în timpul replicării. Originea replicării este la 82,7±2% de la capătul stîng al moleculei liniare mature.

Structura ADN este schimbată în regiunea c II—O prin transcriere, încît ea este recunoscută de complexul de replicare. Astfel, transcrierea determină o translocare a acestei regiuni la o localizare în celulă pe membrană, unde asupra ei poate acționa complexul de replicare. Transcriptul de dreapta poate servi ca primer pentru inițierea replicării în direcția de dreapta, astfel că ARN-polimeraza de *E. coli* joacă un oarecare rol în inițierea replicării ADN λ, intrînd ca o parte integrantă a complexului de replicare în timpul inițierii. În ciclul litic ADN λ se replică o dată sau de două ori spre a da molecule circulare fiice, după care în replicarea sa predomină modelul inelului rotativ.

Un derivat al lui λ — virusoid desemnat λ dv — este unul dintre cei mai mici repliconi (vezi și cap. XIII). El reprezintă o structură circulară care păstrează din ADN de la tipul sălbatic doar regiunea de la P_RO_R pînă la capătul genei P. Gena c II pare a fi dispensabilă lui λ dv, pe cînd celelalte gene ale sale — cro, O și P — sînt esențiale, asigurînd replicarea sa autonomă.

La SV40 ADN este o structură bicatenară, circulară covalent închisă ce conține ture negative de superspiralizare. Aceasta a fost desemnată ADN I. În replicare are loc creșterea monocatenară și formarea unei molecule bicatenare circulare deschise care a fost desemnată ADN II. Prin intervenția enzimelor de îndepărtare a supraspiralelor este realizată despiralizarea structurii. În timpul replicării molecula ADN SV40 ia forma caracteristică theta. Replicarea este dependentă în cea mai mare parte de aparatul enzimatic al celulei gazdă, un singur produs genic viral dirijînd inițierea replicării (Salzman și colab., 1974).

18. **Replicarea ADN la eucariote.** Modul semiconservativ de replicare a cromozomului eucariot a fost demonstrat de către Taylor și colab. (1957) și Delbruck și Stent (1957).

Sinteza ADN este restrînsă doar la o mică parte a interfazei (stadiu S) a cărei durată este mai mică în stadiile timpurii ale embriogenezei comparativ cu celulele diferențiate. Stadiul S premergător meiozei este foarte lung.

La eucariote aspectele biochimice și biofizice ale replicării ADN sînt identice cu cele de la procariote. Cromozomul eucariot, la nivelul căruia se află o singură macromoleculă de ADN, este însă o unitate de replicare multirepliconică (foto V). Se estimează între 200 și 1500 repliconi liniari și independenți dispuși în tandem de-a lungul macromoleculei de ADN a cromozomului eucariot (Huberman și Riggs, 1968).

Scanned with OKEN Scanner

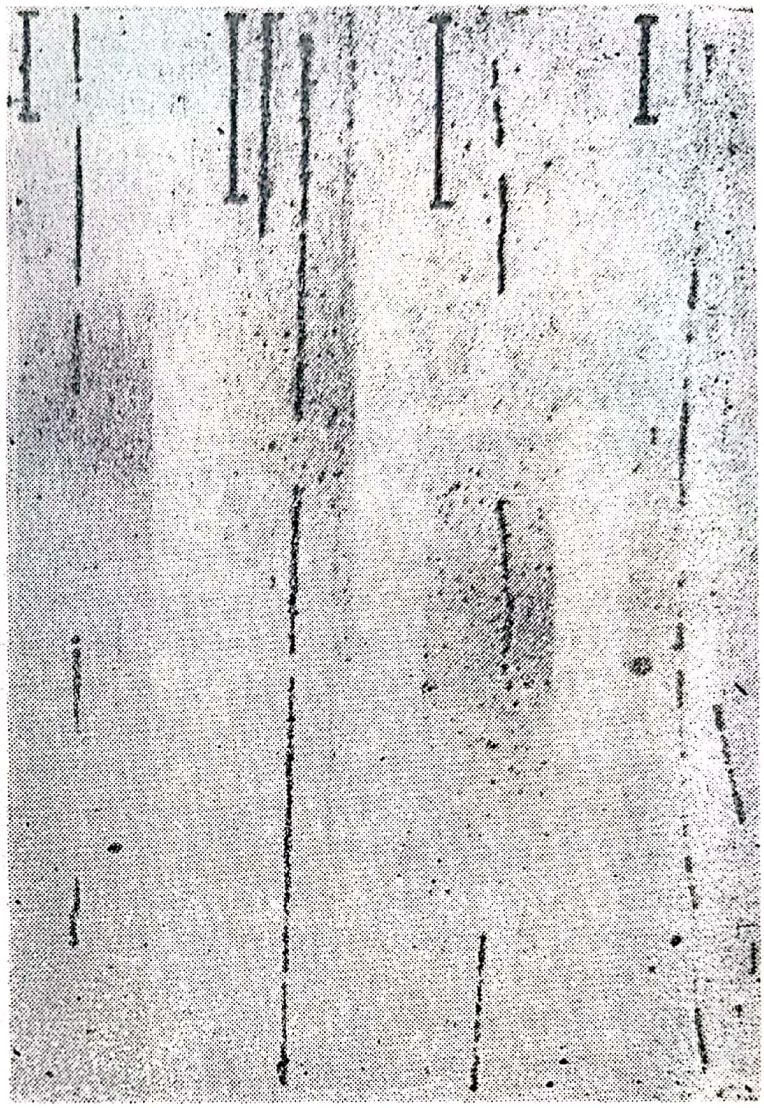


Foto. V — **Autoradiogramele ADN din celule umane HeLa şi celule de hamster chinezesc,** marcate pulsatoriu cu ^{3}H-timidină, în timpul replicării. Scala 50 μm (după J. A. Huberman şi A. Tsai, 1973).

Dimensiunea repliconilor eucariotici este egală cu aceea a repliconului viral iar uneori chiar cu aceea a repliconului bacterian, avînd circa 100 000 perechi de nucleotide. Distanţa dintre punctele de iniţiere este de 15—120 μm la hamsterul chinezesc şi 25—145 μm la găină (Callan, 1974). Replicarea este discontinuă şi bidirecţională. Fragmentele Okazaki sînt de 10—20 de ori mai mici decît cele de la procariote, avînd circa 100 nucleotide lungime. Din unirea lor rezultă fragmente de lungime intermediară, care reprezintă catenele fiice în creştere (Huberman şi Horwitz, 1974). Sinteza este de tip continuu, sau în piese mari pe o catenă (catena *leading*) şi de tip discontinuu (în piese mici) pe cealaltă catenă (catena *lagging*) (Hershey şi Taylor, 1974).

Sinteza ADN este asincronă nu numai intracromozomal (diverşii repliconi ai unui cromozom iniţiază sinteza ADN în momente diferite ale stadiului S), dar şi intercromozomal, diferiţii cromozomi ai complementului cromozomal iniţiind şi terminînd sinteza ADN în diferite momente ale stadiului S.

Scanned with OKEN Scanner

Sistemul de replicare eucariot este mai puțin cunoscut și înalta fidelitate de replicare a ADN eucariotic este greu de reconciliat cu lipsa activității de corecție exonuclează 3′→5′ la ADN-polimerazele eucariote.

Bifurcația de replicare la eucariote trebuie să treacă peste histonele nucleozomale, din care cauză viteza sa de deplasare este mai mică (2,6 kilobaze/min) decît la procariote, rata de replicare a ADN eucariot (100 nucleotide/s) fiind mult mai mică decît aceea de la procariote.

Replicarea moleculelor liniare de ADN, fie la procariote, fie la eucariote, ridică problema umplerii golului care ia naștere prin excizia ARN primer de la capetele libere 5′ ale moleculelor fiice care nu poate fi realizată de către ADN-polimerază căci nu are un capăt liber reactant 3′—OH adiacent care să servească drept primer. O astfel de problemă nu o ridică replicarea structurilor circulare care nu au capete libere. Pentru soluționarea acestei probleme s-au sugerat două mecanisme posibile, circularizarea și concatemerizarea, ambele implicînd însă existența unor secvențe terminale repetate.

Cavalier — Smith (1974) și Bateman (1975) au elaborat un model bazat pe existența unor secvențe palindromice (cu simetrie inversă, rotatorie de tip ABC X YC′B′A′) aflate la capetele moleculelor liniare, pe baza cărora, prin pliere înapoi, pe ele înseși capătul 3′—OH al segmentului rămas nereplicat al moleculei liniare va lua o configurație de ac de păr (*hairpin*) și va servi ca primer pentru sinteza unui segment complementar aceluia care a rămas nereplicat.

Se admite că punctul de inițiere al fiecărui replicon eucariotic este reprezentat de o secvență palindromică care, sub acțiunea unei proteine inițiatoare, ia configurația cruciformă (vezi cap. X), recunoscută de ADN-polimerază. Acest lucru se realizează și sub acțiunea proteinelor de despiralizare de la *Ustilago maydis* și timus de vițel. Prezența secvențelor palindromice la nivelul telomerelor este considerată o condiție sine qua non pentru replicarea capetelor cromozomilor liniari eucariotici. Dacă cromozomii eucariotici ar avea organizarea supracromozomală circulară propusă de DuPraw (1970), atunci replicarea genomului eucariot ar fi similară cu aceea a cromozomului bacterian. Sînt date care afirmă existența la unele animale a unei continuități a cromozomilor în timpul sintezei ADN, dar ele trebuie confirmate (Nagl, 1977). Și la eucariote, în unele situații, sinteza ADN se realizează după modelul inelului rotativ. Astfel, în amplificare ADN ribozomal apare sub forma unor structuri circulare, detașate de cromozomi, fiind libere deci în nucleoplasmă. Astfel de structuri circulare de ADN au fost evidențiate la *Physarum polycephalum* și în ovocitele amfibienilor.

Reglarea sintezei ADN are loc la mai multe nivele; al individului biologic, al țesutului, al celulei și al moleculei ADN. Asincronia în

Scanned with OKEN Scanner

replicarea ADN al cromozomilor setului haploid asincronic inter- și intracromozomală, este în parte legată și de distribuția zonelor eucromatice și heterocromatice. Deși nu totdeauna, heterocromatina se replică în ultima parte a fazei S, prezentînd deci replicare tardivă. Zonele eucromatice au replicare timpurie.

Replicarea ADN este programată, urmînd în ontogenie un model identic, specific fiecărui cromozom, punctele de inițiere a replicării manifestîndu-se constant de la un ciclu celular la altul, prezentînd o aceeași succesiune relativă în intrarea în funcție. Numai în cazuri patologice acest model este alterat.

Genele responsabile de controlul genetic al replicării ADN cad sub influența complexă a factorilor de mediu hormonali, asigurîndu-se o replicare diferențiată care determină schimbări evolutive și economice ale ciclului celular, implicate de asemenea în citodiferențiere. Și la eucariote semnalele citoplasmatice joacă un rol important în activarea punctelor de inițiere, fapt dovedit în experiențe de transplant de nuclee sau de fuziune celulară (reactivarea și replicarea ADN din nucleele eritrocitelor de găină în urma fuziunii cu celulele enucleate de alt tip). De asemenea, membrana nucleară poate avea un rol bine determinat în replicare, cromozomii eucariotici fiind atașați la aceasta pe fața sa internă, în puncte bine determinate, de inițiere și terminare care alternează de-a lungul cromozomului, între două puncte de terminalizare existînd bucle de 90—180 kilobaze ce corespund unui replicon. Microscopia electronică combinată cu autoradiografia indică existența de puncte de replicare în toată masa nucleului, ceea ce nu concordă cu modelul atașării punctelor de inițiere la membrană. Dar atașarea la membrană este o realitate (evidențiată și la *Euglena* — Gavrilă, 1978) și oferă o cale plauzibilă pentru inițierea replicării cromozomale, membrana nucleară avînd un fel de rol organizatoric, funcționînd ca un fel de „cuier" pe care se prind ordonat cromozomii interfazici decondensați și aparent încîlciți, ușurînd astfel mecanica replicării (Comings și Okada, 1973).

La nivelul inițiatorului (aflat în centrul repliconului, de unde replicarea pornește bidirecțional) și al terminatorului (la capetele repliconului) se admite existența unor secvențe repetate. Secvența inițiatorului ar fi recunoscută de un receptor specific, situat pe fața internă a membranei nucleare și care cuprinde un complex proteinic printre care și o endonuclează de restricție specifică, responsabilă de recunoașterea secvenței inițiatorului din ADN.

La eucariote replicarea ADN este sincronizată cu sinteza histonelor și cu sinteza de ARN primer ca și a altor proteine cromozomale. Spre deosebire de proteinele destabilizatoare, histonele stabilizează structura dublu-catenară a ADN, participînd la împachetarea ADN în cromozomi. Proteinele nonhistonice pot juca de asemenea un rol esențial în inducția sintezei ADN. În meioză apare o replicare tîrzie

Scanned with OKEN Scanner

de ADN în profaza I, fapt evidențiat la *Lilium* de către Hota și Stern (1971). Acest ADN replicat în zigoten nu este încadrat în ADN nuclear replicat premeiotic, rămînînd goluri în cromozomi. Repliconii neterminalizați sînt în numeroase cazuri ficși, acționînd după unele ipoteze ca puncte intergenice de recombinare sau ca situri de integrare pentru genomul viral. Această ipoteză a repliconului deschis, emisă de Whithouse, este aplicabilă în transformarea malignă și citodiferențiere (Nagl, 1977).

Replicarea diferențiată apare mai ales în cadrul endociclurilor (sinteza ADN nu este urmată de diviziunea celulară). Replicarea diferențiată reglează activ conținutul de informație genetică și elementele de control ale unui genom dat. Astfel, în celulele suspensorului embrionar de la *Tropaeolum*, în celulele poliploide alungite ale epicotilelor de mazăre, fasole și Cucurbitaceae, ca și în ADN satelit din țesuturile poliploide de *Drosophila virilis* are loc o subreplicare a heterocromatinei. Se admite că și la nivelul interbenzilor cromozomilor politeni are loc o subreplicare (Laird, 1978), replicarea ADN la acești cromozomi avînd loc pe cînd ei rămîn vizibili microscopic (Callan, 1974).

Subreplicarea heterocromatinei pericentrice este legată de lipsa diviziunii în cazul endociclurilor, nemaifiind necesară atașarea fibrelor fusului de diviziune la centromerii cromozomilor. Subreplicarea a fost evidențiată și la insecta *Planococcus citri* la care masculul are 5 cromozomi eucromatici de proveniență femelă și 5 cromozomi heterocromatici de proveniență mascul. Oenocitele poliploide și celulele tecii testiculare au 5 cromozomi heterocromatici și pînă la 80 cromozomi eucromatici. Aceasta înseamnă că pe cînd cromozomii materni eucromatici se replică prin numeroase cicluri endomitotice, cei paterni nu se mai replică. Este deci vorba de subreplicarea cromozomilor heterocromatici (Nur, 1966). Fenomenul subreplicării a fost remarcat și în cazul cromozomilor heterocromatici B de la planta *Rhinanthus*, la care cromozomii setului obișnuit (A) prin extrareplicare devin politeni în celulele haustorului endospermului. Rezultă că, de regulă, subreplicarea însoțește endopoliploidia. Fenomenul opus ei este amplificarea sau suprareplicarea (extrareplicarea), întîlnită atît în celule diploide, cît și în celule poliploide. Ea duce la multiplicarea unor matrițe pentru ARN ribozomal sau pentru anumiți reglatori. Suprareplicarea a fost descrisă la insectele Sciaridae. La *Rhynchosciara angelae* un locus din secțiunea a 2-a a cromozomului B se umflă puternic prin extrareplicare, căpătînd aspect bandat. În acest caz pufele numite pufe ADN nu reprezintă manifestarea transcrierii (și în cazul acțiunii unor hormoni apar pufe fără să aibă loc sinteza de ARN), ci ele reprezintă exteriorizarea extrareplicării. La *Sciara coprophyla*, înainte de împupare apar pufe ADN prin extrareplicare în cel puțin patru regiuni ale complementului cromozomal. La *S. ocellaris* un

Scanned with OKEN Scanner

omolog produce mai mult ADN decît celălalt, aici fiind vorba de o extrareplicare asimetrică (Perondini și Dessen, 1969).

În condiții vitrege (carență în anumite nutriente, senescență) are loc eliminarea unei părți din ADN satelit (la șoarece) sau din genomul neamplificat *(Euglena)*. ADN amplificat este metabolic labil și după îndeplinirea funcției sale este degradat. Suprareplicarea, subreplicarea și eliminarea selectivă a heterocromatinei duc la variații mari în cantitatea de ADN, făcînd să apară excepții de la regula constanței cantitative a ADN (John și Lewis, 1975).

19. **Semnificația secvenței de baze, a structurii bicatenare și a replicării semiconservative a ADN.** Structura polinucleotidică a macromoleculei de ADN permite o multitudine de aranjamente care asigură marele său potențial de eterogenitate. Numai un segment ADN lung de 100 perechi de nucleotide prezintă variații secvențiale de ordinul a 4^{100}. Dar orice tip de ADN natural are o secvență de nucleotide mult mai mare decît acesta, adică un potențial enorm de diversitate secvențială, potențial care face ca fiecare specie să aibă propria sa informație genetică. Această diversitate primară de informație genetică este amplificată în sistemele biologice prin mecanismele mutației și ale recombinării care determină ca fiecare individ al unei specii date să aibă propriul său statut genetic, neexistînd în natură indivizi identici genetic.

În mod natural există și conformații monocatenare ale macromoleculei de ADN (tipic este ADN al fagului ΦX 174). Cum informația genetică este reprezentată de modul cum se succed bazele azotate în catena ADN, structura monocatenară ar putea fi prezentă la toate sistemele biologice și ar fi suficientă pentru codificarea informației genetice. Care este atunci rostul celei de-a doua catene polinucleotidice, întîlnită în structurile bicatenare ale ADN al tuturor viețuitoarelor? Întrebarea își găsește răspuns cert prin faptul că mecanismul eredității face un interesant joc de doi de la nivelul molecular pînă la acela al indivizilor biologici, joc care se poate înscrie în principiile teoriei jocurilor, înrudite cu teoria informației și încadrate în teoriile de sistem. Astfel, macromolecula de ADN are structură bicatenară bazată pe împerecherea exactă a cîte două baze complementare. Chiar atunci cînd structurile genetice sînt în mod natural monocatenare, ele iau în timpul replicării configurații dublu-catenare (Sinsheimer și colab., 1962). Cromozomul eucariot prezintă două cromatide surori, la nivelul fiecăreia aflîndu-se cîte două cromoneme. Organismele diploide au un complement cromozomal alcătuit din două seturi de cromozomi, doi cîte doi cromozomi fiind omologi. În timpul meiozei are loc conjugarea a doi cîte doi cromozomi omologi spre a se forma bivalenții la nivelul cărora are loc recombinarea genetică. Organismele ce se reproduc pe cale sexuată prezintă două sexe separate, dar complementare,

Scanned with OKEN Scanner

diferenţiindu-se două tipuri de celule reproducătoare, a căror contopire stă la baza genezei unui nou organism. Desigur, jocul acesta de doi ar putea fi extins.

Din punctul de vedere al teoriei informaţiei, duplicitatea este legată pe de o parte de asigurarea unei transmiteri fidele a cantităţii primare de informaţie genetică, iar pe de alta de conservarea ei, nefiind vorba de o redundanţă cum adesea în mod greşit se apreciază, ci de necesitatea transmiterii fidele a informaţiei de care depinde întreaga funcţionare a sistemului biologic. Fără a putea epuiza răspunsul cerut de o asemenea întrebare crucială pentru biologie în general şi pentru biologia moleculară în special, unele laturi ale sale vor putea fi desprinse din analiza funcţiei de replicare şi transcriere a ADN.

În acest joc de doi pe care îl face fenomenul ereditar, replicarea are un rol central, făcînd ca structuri unice să fie duplicate.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul IV

STRUCTURA ARN ȘI TRANSCRIEREA GENETICĂ

1. Structura ARN. Acizii ribonucleici (ARN) sînt compuși poliribonucleotidici sintetizați prin polimerizarea a patru ribonucleotide: AMP, GMP, UMP și CMP (Grunberg — Manago, 1959), reacție catalizată de transcriptază sau ARN-nucleotidiltransferază (numită încă ARN-polimerază dependentă de ADN în cazul acizilor ribonucleici celulari), sau ARN-polimerază dependentă de ARN (numită încă replicază sau ARN-sintetază, în cazul acizilor ribonucleici virali).

Cu excepția formei replicative a ARN al virusului encefalitei șoarecilor, care este circulară, toate moleculele ARN, inclusiv cele virale sînt de formă liniară.

Cercetările lui Chargaff (1950) au indicat că în macromolecula ARN raporturile molare dintre baze variază în limite mari, depinzînd de sursa din care se izolează. Raportul A/U și G/C este diferit de 1, ceea ce indică absența de regulă a unei structuri bicatenare complementare. În afara celor patru ribonucleotide comune ale A, G, C și U, în unele tipuri de ARN se află și baze mai puțin comune, precum pseudouridina (ψ), baze metilate, tiouracil etc.

Structura primară a ARN este reprezentată de secvența de ribonucleotide din monocatena sa (fig. 24). Și la ARN se întîlnește o structură secundară bazată pe împerecheri intracatenare de baze complementare de tip A—U și G—C, cu apariția de bucle caracteristice la nivelul regiunilor rămase neîmperecheate. ARN al unor virusuri este bicatenar, cum bicatenare sînt și formele replicative ale tuturor ribovirusurilor cu ARN monocatenar. Se distinge, de asemenea, o structură terțiară reprezentată de conformația tridimensională a regiunilor împerecheate sau neîmperecheate.

Lungimea diferitelor tipuri de ARN variază de la 75 la 10 000 nucleotide. Cele mai mici molecule de acizi nucleici naturali sînt reprezentate de cele de ARN de transfer (ARNt). Ele au pînă la 80 de nucleotide. ARN ribozomal de tip 5S are circa 100 nucleotide, iar diferitele tipuri de ARN viral au circa 1500—3000 nucleotide (Ebel, 1972). Monocatena de ARN este stabilă grație prezenței punților fosfodiesterice dintre ribonucleotide (C—3') O—P—O (C—5'). Se

Scanned with OKEN Scanner

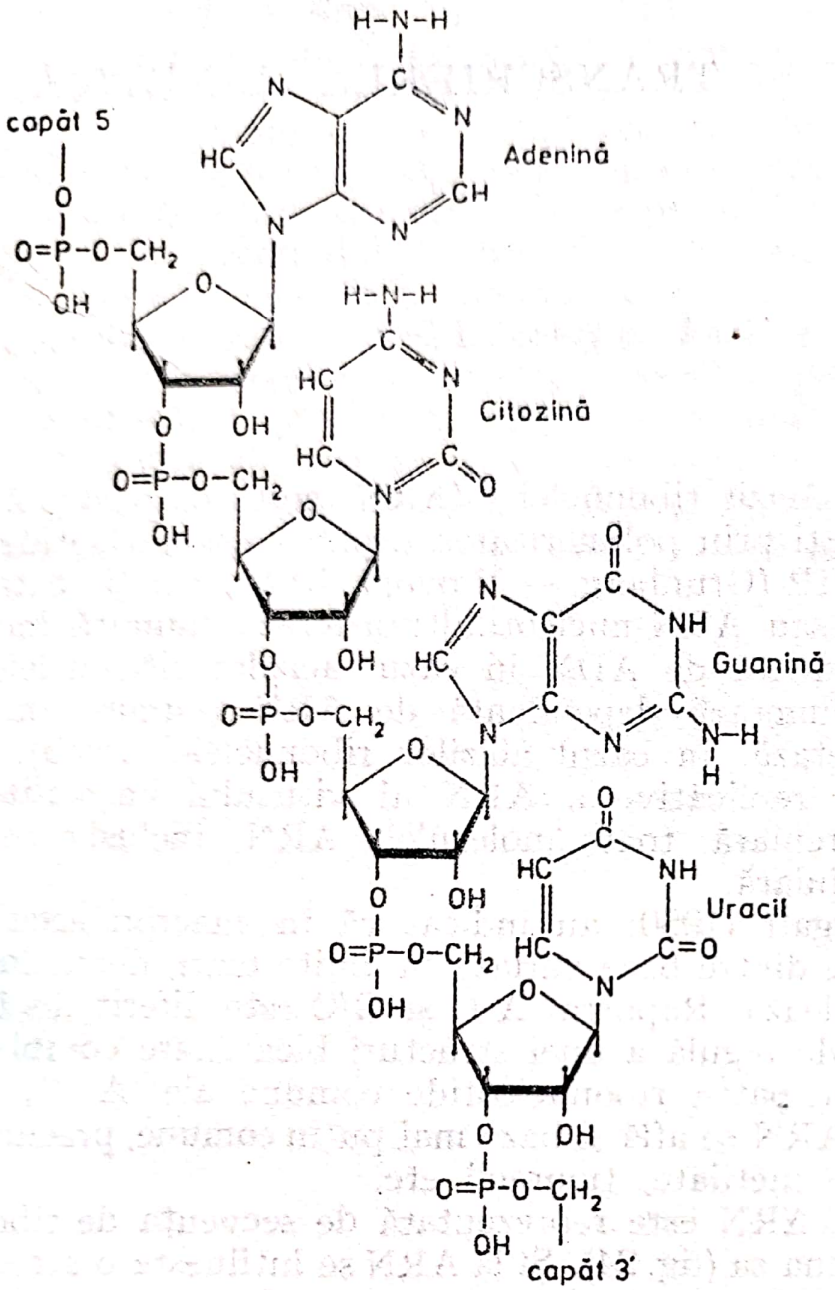


Fig. 24. **Structura chimică a unui segment ARN.**

vorbește și de implicarea lui C—2′ în legătura fosfodiesterică care ar duce la răsucirea ribonucleotidului determinînd punctul de inițiere și de sfîrșit al unei bucle în monocatena ARN. Dar asemenea legături, chiar dacă există, sînt foarte rare.

În ultimul timp s-au obținut rezultate deosebite în secvențierea ARN. Fragmentarea ARN în vederea secvențierii se realizează cu ajutorul ribonucleazei pancreatice și al ribonucleazei T_1 din *Aspergillus oryzae* sau hidroliza alcalină cu formarea de mono- sau oligonucleotide care sînt analizate microanalitic, după ce sînt desfăcute în mononucleotide cu ajutorul fosfodiesterazei din venin de șarpe (Gilham, 1970). Folosindu-se electroforeza bidimensională în cadrul metodei Sanger, se obțin amprentele electroforetice *(fingerprint)* ale acestor mononucleotide sau oligonucleotide. În ultimul timp, metodele de

Scanned with OKEN Scanner

secvențiere ARN au fost mult îmbunătățite (Szekeley, 1977), aplicîndu-se și metoda „+" și „—" folosită în secvențierea ADN.

Capetele unei monocatene ARN sînt 3'—OH și 5'-fosfat. Structura secundară a ARN este comparabilă cu forma A a ADN și formarea sa este însoțită de efectul hipocrom.

Acizii ribonucleici virali constituie materialul ereditar al ribovirusurilor (Gierer și Schramm, 1957, Fraenkel-Conrat și Singer, 1957). Acizii ribonucleici celulari sînt implicați în transferul și decodificarea informației genetice în procesul de biosinteză proteinică. Toate categoriile de ARN celular sînt sintetizate pe matriță de ADN, în cadrul procesului care a fost numit transcriere genetică (fig. 26), o reacție complexă care are unele trăsături generale ale replicării. În cadrul său, enzima ARN-polimeraza dependentă de ADN recunoaște o secvență specifică de nucleotide dintr-o catenă ADN (Chamberlain și Berg, 1962; Hurwitz și colab., 1963), se atașează la aceasta și catalizează polimerizarea unor ribonucleotide care se împerechează succesiv cu bazele azotate ale catenei ADN pe principiul complementarității Watson — Crick (A—U; T—A; C—G; G—C). În acest fel structura ARN este determinată de structura matriței ADN. De exemplu, cînd se folosește ca matriță forma replicativă dublu-catenară a fagului φX 174, secvența de baze azotate din matrița ADN este transcrisă sub forma unei secvențe complementare în ARN, raporturile molare matriță transcript fiind unitare:

$$A = 0{,}29/0{,}29;\quad T(U) = 0{,}29/0{,}28;\quad G = 0{,}21/0{,}22;\quad C = 0{,}21/0{,}22.$$

Reacția generală catalizată de ARN-polimerază este:

$$(ATP)_n + (GTP)_n + (UTP)_n + (CTP)_n \xrightarrow[Mn^{2+}\text{ sau }Mg^{2+}]{\text{ADN (matriță) + ARN-polimerază}} \rightarrow (AMP - GMP - UMP - CMP)_n + 4n(PPi).$$

În cadrul reacției se realizează un hibrid molecular natural între matrița ADN și monocatena ARN sintetizată, dar aceasta din urmă nu rămîne legată prin punțile de hidrogen formate în urma împerecherii de baze complementare, așa cum se întîmplă în replicarea ADN. Monocatena de ARN se desprinde de pe matriță, fiind disponibilă astfel pentru realizarea traducerii.

În ultimii ani un progres major s-a realizat în studiul transcrierii prin demonstrarea că toate celulele eucariote conțin cîteva tipuri de ARN-polimerază ce diferă prin organizarea și funcția lor. Ele au localizare diferită, nucleară, citoplasmatică, mitocondrială sau cloroplastică (Chambon, 1974). De asemenea, s-a reușit sinteza *in vitro* nu numai a ARN, dar și a genelor pentru ARN și s-au făcut pași mari în secvențierea diferitelor tipuri de ARN, analizîndu-se genetic, biochimic și electronomicroscopic complicatul proces de transcriere.

Scanned with OKEN Scanner

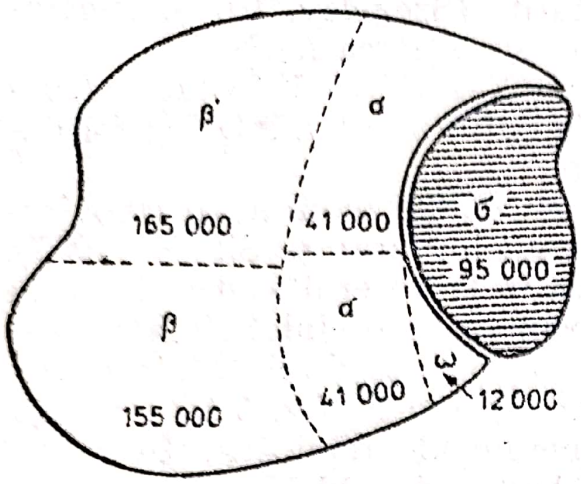


Fig. 25. Structura ARN-polimerazei de E.coli cu subunităţile şi greutăţile moleculare corespunzătoare.

2. **ARN-polimeraza bacteriană.** Cel mai bine caracterizată este enzima izolată de la *E. coli*. Ea este reprezentată de o macromoleculă oligomerică cu o greutate moleculară de 400 000—500 000 daltoni avînd peste 4000 resturi aminoacizi. Sînt două forme active ale enzimei denumite *holoenzima ARN-polimerazică* şi *miezul enzimatic*. Holoenzima este disociată de uree 6M în 5 subunităţi. Miezul enzimatic este lipsit de o singură subunitate (subunitatea sigma — σ) care conţine 780 resturi aminoacizi). Spre deosebire de holoenzimă, miezul enzimatic are alterată capacitatea de legare de matriţa ADN şi de iniţiere a catenei ARN. Miezul enzimatic al ARN-polimerazei bacteriene poate însă să transcrie ADN străin (din timus de viţel, de exemplu). Prima semnalare a separării ARN-polimerazei în miezul enzimatic şi factorul σ este făcută de Burgess şi colab. (1969).

Spre deosebire de ADN-polimerază, ARN-polimeraza are capacitatea de a recunoaşte anumite secvenţe din matriţa ADN, ce au valoare de semnale specifice; în acelaşi timp, enzima transcrie cu mare fidelitate secvenţa de baze de pe un anumit segment din ADN, realizîndu-se astfel transferul de informaţie genetică ADN→ARN.

Capacitatea de recunoaştere specifică de secvenţe din ADN de către ARN-polimerază este deţinută de subunitatea sa σ. Analiza activităţii ARN-polimerazei dependente de ADN se realizează urmărind conversia nucleozidelor trifosfat (marcate în restul nucleozidic cu ^{3}H sau ^{14}C sau în α-fosfat cu ^{32}P) într-o formă acid insolubilă reprezentată de ARN.

ARN-polimeraza de *E. coli* are o structură complexă (Burgess, 1969, 1971) prezentînd patru subunităţi majore simbolizate: β', β, α, σ şi o componenţă minoră ω (fig. 25), avînd următorul raport stoichilometric: β', β, 2α, σ şi 2ω.

Subunitatea ω apare într-unul sau două exemplare la *E. coli*, dar nu a fost evidenţiată şi la alte bacterii (Kornberg, 1974), iar prin îndepărtarea sa, holoenzima nu-şi pierde activitatea *in vitro*, dar ar putea fi indispensabilă pentru activitatea sa *in vivo*. După denaturare

Scanned with OKEN Scanner

cu dodecilsulfat de sodiu a preparatelor enzimatice pe geluri acrilamidice s-a dedus următoarea greutate moleculară a subunităților:

$$\beta' = 150\,000 - 165\,000;\ \beta = 145\,000 - 155\,000\ \sigma = 86\,000 - 95\,000;\ \alpha = 39\,000 - 41\,000;\ \omega = 9\,000 - 12\,000.$$

Subunitatea β′, care conține în ea și doi atomi de Zn, participă în prima etapă de legare la matriță, avînd un caracter mult mai bazic decît subunitatea β. Cercetări recente (Halling și colab., 1978) implică această subunitate și în rezistența la streptolidigină, antibiotic care blochează elongarea catenei ARN. Subunitatea β este implicată în inițierea și elongarea catenei ARN. Ea conține situl de legare a rifampicinei la ARN-polimerază, fapt evidențiat la mutanții de *E. coli*, rezistenți la rifampicină și care prezintă alterări la nivelul acestei subunități. Subunitatea β prezintă zone pentru atașarea specifică a subunităților α. La *E. coli* ea este specificată de gena N. Rolul subunității α este mai puțin cunoscut. În soluție ea apare ca dimer, conținînd legătura SS.

Subunitatea σ apare ca un factor alosteric ce se leagă la subunitatea β′. Ea este esențială în recunoașterea promotorului și deci în inițierea transcrierii, conferind specificitate ARN-polimerazei. Astfel, la fagul T_4, în absența acestei subunități, transcrierea efectuată de către miezul enzimatic al ARN-polimerazei nu numai că este mai puțin eficientă, dar este haotic inițiată. În schimb, în prezența sa, holoenzima ARN-polimerazei efectuează o transcriere eficientă și totodată ordonată, fiind transcrise mai întîi genele timpurii, ai căror produși sînt necesari în primele stadii ale infecției și numai după aceea sînt transcrise și celelalte gene (genele tîrzii).

Subunitatea σ conține grupe sulfhidril și astfel este alterată de agenți ce au specificitate de acțiune pentru asemenea grupe. La *E. coli* au fost cartate genele care specifică toate subunitățile ARN-polimerazei. Bunăoară gena rpo B codifică subunitatea β a ARN-polimerazei de *E. coli*.

3. Desfășurarea procesului de transcriere. Transcrierea este un proces complex reprezentînd o succesiune ordonată de evenimente biochimice care cuprinde inițierea, elongarea și terminarea catenei ARN (fig. 26).

1. *Inițierea.* Transcrierea are loc, de regulă, numai la nivelul unor anumite segmente ale matriței ADN. Inițierea transcrierii este precedată de o fază numită de selecție-inițiere în care are loc legarea ARN-polimerazei la matriță (foto VI) la nivelul unei secvențe specifice de nucleotide (recunoscută în mod specific de enzimă prin subunitatea sa σ) unde are loc o desfacere *(unwinding)* a dublului-helix ADN. Această secvență specifică este numită promotor, reprezentînd o

Scanned with OKEN Scanner

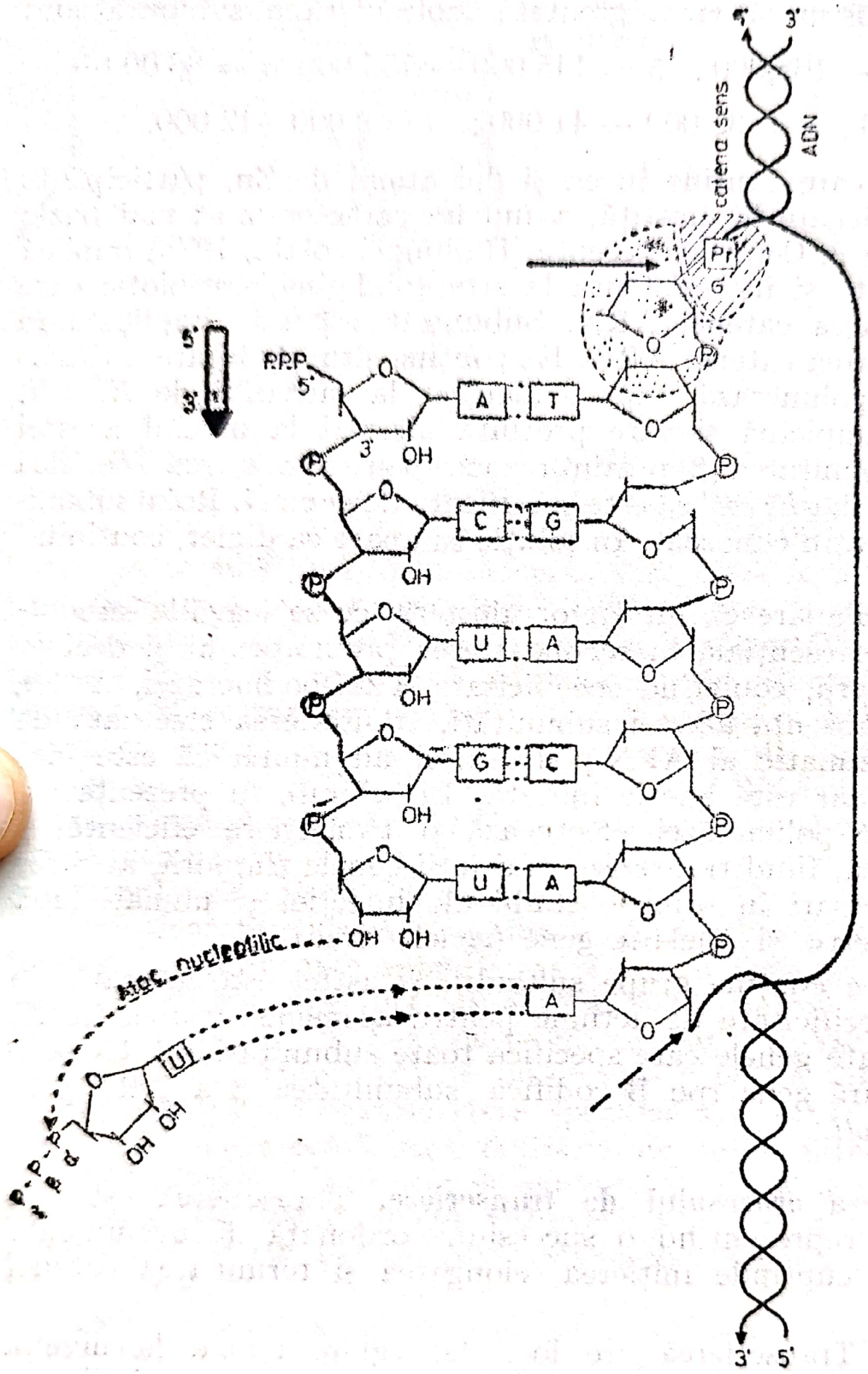


Fig. 26. Schema transcrierii genetice: suprafața punctată — miezul enzimatic al ARN-polimerazei; suprafața haşurată — subunitatea sigma; Pr — promotor; săgeata simplă — punctul de inițiere a transcrierii; săgeata întreruptă — punct de terminalizare; săgeata dublă — direcția de transcriere.

Scanned with OKEN Scanner

Foto VI — **Electronofotografie arătînd ataşarea moleculelor de ARN-polimerază (săgeţile) la o monocatenă de ADN** (din Goodenough şi Levine, 1974).

regiune din ADN lungă de pînă la 50 nucleotide, localizată înaintea regiunii operatoare a operonului. ARN-polimeraza se leagă la ADN la nivelul adîncimii mici. Faza de selecţie-iniţiere duce la aşa-numita selecţie a promotorului. Acestei faze îi urmează iniţierea propriu-zisă a transcrierii în cadrul căreia are loc împerecherea unui ribonucleozidtrifosfat purinic, ATP sau GTP, plasat în situl de iniţiere al ARN-polimerazei, cu primul dezoxiribonucleotid al secvenţei din matriţa ADN ce urmează a fi transcrisă. La fagul T_7 în ADN s-au evidenţiat două puncte de iniţiere care pe o catenă începe cu ATP iar pe cealaltă catenă cu GTP. Pluralitatea punctelor start în regiunea promotorului condiţionează o folosire mai eficientă a matriţei şi o iniţiere mai rapidă a transcrierii.

La fagul λ, la început ARN-polimeraza se leagă neordonat la matriţă, de-a lungul întregii catene ADN, cu formarea unor complexe labile ADN—ARN-polimerază, după care legarea devine exactă la nivelul regiunii promotoare şi adiacent ei. În acest moment au loc modificări conformaţionale ale ARN-polimerazei care determină iniţierea propriu-zisă a transcrierii.

În timpul iniţierii, la nivelul sitului promotor se formează un complex binar ADN—ARN-polimerază care este foarte stabil iar separarea unor asemenea complexe a adus un remarcabil progres în studiul interacţiunii ADN—ARN-polimerază. Enzima prezintă o mult mai mare afinitate şi specificitate faţă de situl promotor, comparativ cu celelalte regiuni ale segmentului transcris, fapt esenţial pentru selecţia rapidă a acestuia în procesul de iniţiere a transcrierii. Există şi ideea că, de fapt, ARN-polimeraza nu ar recunoaşte secvenţe specifice din ADN la nivelul promotorului, ci mai curînd elemente

Scanned with OKEN Scanner

de structură terțiară a ADN care apar la nivelul regiunii promotoare și care au la bază prezența palindroamelor.

Paralel cu atașarea holoenzimei la ADN în vederea expunerii matriței are loc o desfacere (topire sau denaturare) locală a structurii bicatenare a acesteia la nivelul promotorului cu formarea așa-numitului „ochi de transcriere". Desfacerea locală a duplexului ADN sub acțiunea ARN-polimerazei ar putea sta și la baza inițierii replicării ADN. După terminarea transcrierii structura bicatenară a ADN se reface la parametrii săi inițiali. După realizarea inițierii, complexul binar ADN—ARN-polimerază trece în complexul ternar ADN—ARN-polimerază — ARN, caracteristic elongației catenei, în care ADN trece din forma B în forma A. Complexul ternar asigură cel de-al doilea tip de transfer de informație genetică, și anume de la ADN la ARN. Ca o caracteristică esențială și generală a transcrierii apare faptul că situl promotor ca și regiunea operatoare nu sînt transcrise, sau dacă sînt transcrise nu sînt incluse în transcriptul final, fiind eliminate prin prelucrări posttranscripționale (Blattner și Dahlberg, 1972). ADN nativ, bicatenar funcționează mult mai eficient ca matriță pentru ARN decît cel denaturat (monocatenar).

Situl nucleotidului de inițiere al ARN-polimerazei în care este legat specific nucleozidtrifosfatul destinat să devină trifosfatul 5′-terminal al catenei ARN se află în subunitatea β a enzimei, fapt demonstrat de blocarea legăturii ATP și GTP la acest sit sub acțiunea rifampicinei.

Datele actuale nu pot preciza încă ce reprezintă prin sine situl de inițiere dar, deoarece s-a stabilit că nucleozidul de la capătul 5′ al catenei născînde de ARN conține totdeauna o bază purinică, s-a emis părerea că situl de inițiere a transcrierii ar putea fi o grupare de pirimidine pe matrița ADN (Szybalsky și colab., 1966). Inițierea catenei ARN nu presupune existența unui primer, din care cauză primul ribonucleotid rămîne cu trifosfatul intact în poziția 5′, dar oferă o grupare reactantă 3′—OH.

2. *Elongația.* Grupa 3′—OH a primului ribonucleotid efectuează un atac nucleofilic asupra fosfatului α al trifosfatului celui de-al doilea nucleotid fixat în situl de elongație al enzimei și care s-a împerecheat cu baza complementară de pe matriță. Astfel începe transcrierea propriu-zisă a unei catene ADN și elongarea catenei ARN. Între primul ribonucleozidtrifosfat (fie ATP, fie GTP) și cel de-al doilea ribonucleozidtrifosfat se formează o legătură fosfodiesterică covalentă și în acest proces intervine tot subunitatea β a holoenzimei. Se formează astfel un dinucleozid tetrafosfat (5′-monofosfat, 1′ trifosfat) cu eliminarea de pirofosfat anorganic, rezultînd o catenă născîndă de ARN a cărei inițiere e săvîrșită urmînd să aibă loc elongația și terminarea sintezei sale. La *E. coli* și la mulți bacteriofagi, la începutul oricărei catene ARN se află ppp GpUp sau ppp ApUp.

Scanned with OKEN Scanner

După inițiere, în vederea elongației, ARN-polimeraza trece într-o conformație caracteristică transcrierii propriu-zise (elongării catenei) în care prin detașarea subunității σ din holoenzimă de către catena născîndă de ARN, enzima nu mai manifestă o preferință particulară pentru vreun sit anume, ci afinitatea sa este generală pentru întregul segment ADN transcris, facilitîndu-se astfel deplasarea miezului enzimatic de-a lungul matriței ADN. Elongarea catenei ARN se realizează prin adăugarea succesivă de resturi ribonucleozidice monofosfat la capătul 3′—OH al catenei în creștere, ca substrat servind ribonucleozidtrifosfații.

Creșterea catenei ARN are loc în direcția 5′→3′ (Goldstein și colab., 1965; Brenner și colab., 1965), fapt demonstrat cu ajutorul inhibitorului metabolic 3′-dezoxiadenozina. Fosforilat în celulă la 3′-dezoxiadenozintrifosfat, el este atașat la capătul 3′—OH al catenei ARN în creștere, blocîndu-i creșterea ulterioară, deoarece la el nu se mai pot atașa alți ribonucleozidtrifosfați.

Catena ADN este totdeauna citită în direcția 3′→5′ și deoarece cele două catene sînt de polaritate opusă, transcrierea poate apărea în ambele direcții pe diferitele segmente ale macromoleculei ADN, ARN-polimeraza, spre deosebire de ADN-polimerază, neavînd specificitate de direcție, avînd în schimb specificitate de secvență. Totuși, independent de direcție, la nivelul unui segment dat al macromoleculei ADN, transcrierea are loc numai pe o catenă, catena complementară, pentru același segment nefiind de regulă transcrisă. Transcrierea este deci asimetrică.

In vitro, ARN-polimeraza purificată de *E. coli* transcrie ambele catene ale dublei-elice ADN realizînd deci o transcriere simetrică. Dar *in vivo* transcrierea este asimetrică, fapt demonstrat biochimic în cazul fagului λ, la care doar catena grea (H) a ADN funcționează ca matriță pentru sinteza ARN, realizînd cu acesta (transcriptul său) un hibrid molecular (Taylor și colab., 1967).

Același lucru a fost demonstrat la fagul φX 174 la care catena „—" a formei replicative dublu-catenare funcționează ca matriță pentru sinteza ARN aceasta fiind deci catena sens. Dar copierea unei singure catene a dublului-helix nu exclude posibilitatea ca și cea de-a doua catenă să fie activă în transcriere. Dacă ambele catene ADN s-ar transcrie simultan, ar lua naștere două catene complementare de ARN care, interacționînd, ar da o moleculă dublu-catenară ineficientă în traducerea informației genetice, sau ar duce la sinteza a două proteine diferite, fapt care nu a fost dovedit încă. Sinteza unui ARN biologic activ este însă condiționată de structura dublu-catenară a ADN. Transcriere asimetrică a fost demonstrată și la fagul SP_8 de *B. subtilis* care are un ADN dublu-catenar cu $\rho = 1{,}743$ ce se poate separa într-o catenă grea ($\rho = 1{,}762$) și o catenă ușoară ($\rho = 1{,}756$). După denaturare, ele se separă în gradient de densitate și, în urma hibri-

dării cu ARN sintetizat în celula infectată, se constată că acesta hibridizează doar cu catena grea.

La virusurile mici, ce conţin puţine gene, numai o catenă este „sens". La virusurile mari, ca şi la toate celelalte sisteme biologice, catena „sens" este reprezentată de o catenă a dublei elice pentru unele gene, şi de cealaltă catenă pentru alte gene. De exemplu, la fagul T_4 catena „sens" pentru transcrierea genei r II B este catena uşoară, pe cînd catena „sens" pentru gena 21 este catena grea. Astfel, s-a putut trage concluzia că o catenă dată de ADN prezintă secvenţe lungi de baze ce reprezintă informaţie ce va fi transcrisă, urmată de secvenţe necodificatoare (neinformaţionale) ce nu sînt transcrise, şi care sînt posibil implicate în mecanismele reglării.

Transcrierea se desfăşoară cu o rată de 60 ribonucleotide pe secundă, dar această rată poate fi variabilă, fiind influenţată chiar şi de secvenţa transcrisă. Astfel, anumite secvenţe ale segmentului transcris pot funcţiona ca semnale de încetinire sau chiar de blocare a transcrierii, fiind deci implicate în reglarea transcrierii.

Procesele de iniţiere (I) şi elongaţie (E) pot fi simbolizate astfel:

$$\text{I}: (\text{ADN}) \cdot \text{pppX} + \text{pppY} \xrightarrow{\text{ARN-polimeraza}} (\text{ADN}) \cdot \text{pppXpY} + \text{ppi}$$

$$\text{E}: (\text{ADN}) \cdot \text{pppXpY} + \text{pppZ} \xrightarrow{\text{ARN-polimerază}} (\text{ADN}) \cdot \text{pppXpYpZp} + \text{ppi}$$

+ ppi ş.a.m.d., XYZ reprezentînd ribonucleotide.

3. *Terminarea catenei ARN.* Cînd ARN-polimeraza atinge şi recunoaşte situl de terminare a secvenţei ce trebuie transcrisă are loc terminarea catenei ARN cu eliberarea sa de pe matriţă.

Nu se ştie exact care sînt condiţiile eliberării catenei ARN de pe matriţă. Se admite că desprinderea catenei ARN este legată de stabilitatea mai mare pe care o oferă structura bicatenară a ADN comparativ cu hibridul ADN—ARN. Este de asemenea implicată intervenţia ARN-polimerazei înseşi, ca şi trecerea catenei ARN, după terminarea sintezei sale, dintr-o structură primară într-una secundară (Chamberlain, 1974). După terminarea sintezei şi eliberarea de pe matriţă a monocatenei ARN, aceasta este supusă prelucrărilor posttranscripţionale.

Cercetări recente (hibridare moleculară, electronomicroscopie) au dus la realizarea unei cartări fizice a transcrierii la unii fagi cu localizarea semnalelor de iniţiere şi de terminalizare. Proporţia din ADN care serveşte ca matriţă pentru sinteza ARN poate fi determinată, de asemenea, prin studii de hibridare ADN—ARN, iar hibridarea *in situ* permite localizarea pe cromozomi a genelor ce dirijează sinteza diferitelor categorii de ARN.

4. *Reglarea transcrierii.* ARN-polimeraza joacă un rol vital în transcriere, asigurînd selecţia nucleozidtrifosfaţilor potrivit comple-

Scanned with OKEN Scanner

mentarității lor cu bazele azotate ale matriței ADN. Greșelile de includere au o frecvență foarte mică (mai puțin de 1 la 3000), realizîndu-se o transcriere fidelă a matriței ADN. Deoarece ARN celular nu este implicat în stocarea și transmiterea informației genetice, greșelile de includere ce apar în el, în timpul transcrierii, nu mai sînt transmise la descendenți. Asemenea greșeli nu au gravitatea acelora care apar în replicarea ADN. Transcrierea însă, ca și replicarea, este supusă unor complexe mecanisme de reglaj.

Selecția catenei ce urmează a fi transcrisă este determinată de prezența pe aceasta a sitului specific pentru inițiere, factorul σ mărind specificitatea ARN-polimerazei, limitînd activitatea enzimei doar la această catenă. Dar și alți factori sînt esențiali pentru inițierea transcrierii anumitor gene. Astfel, în transcrierea genelor care dirijează catabolismul lactozei (genele lac), substanțe semnal cu rol reglator cum este proteina activatoare catabolică numită CAP sau CRP (proteina receptoare a AMP) interacționează cu eAMP (adenozin 3′, 5′ monofosfatul ciclic), la un sit specific din regiunea promotorului, spre a determina expresia acestor gene. Absența fie a factorului proteinic, fie a AMP ciclic determină descreșterea inițierii transcrierii de către ARN-polimerază și ca urmare o descreștere a cantității de ARN mesager corespunzător. Tot la fel, alterarea activității adenilatciclazei (care formează AMP ciclic din ATP) sau ciclic AMP-fosfodiesterazei (care clivează ciclic-AMP la 5′ AMP) determină scăderea activității de inițiere a transcrierii.

În procesul de reglare a transcrierii mai sînt implicați și alți factori proteinici. Astfel, factorul M stimulează transcrierea la *E. coli*, pe cea mai mare parte a matriței, iar factorul ψ stimulează transcrierea ARN ribozomal. În reglarea transcrierii un rol important îl poate juca modificarea conformațională (superspiralizarea) a ADN, ca și modificarea sa chimică, sau chiar a însăși ARN-polimerazei.

Reglarea transcrierii apare a fi un proces foarte complicat care intervine atît în inițierea, în elongarea, cît și în terminarea catenei ARN (încheierea transcrierii genei). În operonul triptofan se descrie un segment de ADN numit atenuator localizat între regiunea promotor-operator și prima genă structurală. Atenuatorul reglează fracțiunea de molecule de ARN-polimerază care a realizat inițierea transcrierii și care va asigura transcrierea genelor structurale. Triptofanul acumulat poate să interacționeze cu o proteină de legare la atenuator și să descrească fracțiunea de molecule de ARN-polimerază ce trece la nivelul atenuatorului. Nucleotidul efector guanozin-tetrafosfatul (pp G pp) poate interacționa cu ARN-polimeraza, enzimă alosterică, sau proteina de legare la atenuator și să stimuleze transcrierea la nivelul atenuatorului.

Terminarea (încheierea) transcrierii este de două feluri. Există astfel o terminare directă, indusă de matriță, și anume de o secvență

Scanned with OKEN Scanner

specifică din aceasta care funcționează ca semnal particular recunoscut de către ARN-polimerază. Un asemenea semnal este o secvență polinucleotidică. De exemplu, secvența pUpUpUpUpUpUpA aflată la capătul 3′ al transcriptului λ presupune existența în matrița ADN a unei secvențe polipurinice care funcționează ca semnal al terminalizării. Al doilea tip de terminalizare este realizat prin intervenția unor factori proteinici specifici. Astfel, la *E. coli* s-a evidențiat un factor proteinic responsabil de recunoașterea de către ARN-polimerază a semnalului specific de stopare (bariere transcripționale) a sintezei catenei ARN și eliberarea sa de pe matriță (Roberts, 1969). El a fost desemnat factorul ρ (rho) a cărui GM = 200 000 daltoni fiind alcătuit din șase subunități identice așezate în cerc, secvența terminatoare a transcrierii unei gene fiind încadrată de acest cerc al factorului rho. În absența lui se sintetizează un ARN heterogen, ARN-polimeraza depășind limitele normale ale secvenței genice ce trebuie transcrisă. A fost de asemenea descris și factorul proteinic K cu același rol, având o structură dimerică de polipeptide identice cu GM = 17 000 daltoni.

Dintre agenții ce blochează transcrierea cel mai cunoscut este rifampicina. Ea inhibă selectiv ARN-polimeraza bacteriană și sinteza ARN *in vivo*, legîndu-se de subunitatea β a enzimei și împiedicînd legarea ribonucleozidtrifosfatului inițial. Rifampicina blochează inițierea transcrierii, dar nu poate afecta elongația catenei ARN. Agentul care blochează în mod specific elongația catenei este streptolidigina.

Capacitatea ADN de a funcționa ca matriță pentru sinteza ARN este alterată de agenți specifici de legare la ADN, precum actinomicina D. Aceasta se leagă la concavitatea mare a duplexului ADN, împiedicînd migrarea ARN-polimerazei pe matriță, efectul său cel mai puternic de blocare manifestîndu-se atunci cînd se leagă la două resturi guanilice învecinate. Alți agenți care afectează activitatea de matriță a ADN sînt etidiumbromida, proflavina, neomicina, hedamicina, miracil D etc. În transcriere a fost implicată și enzima ADN-girază prin care sînt înlăturare barierele topologice care stau în calea ARN-polimerazei (Smith și colab., 1978).

4. **ARN-polimerazele induse de infecția fagică.** La *E. coli* apar în urma infecției fagice cu T_7, T_4 și λ (lambda) aparate noi de transcriere și sisteme de control care asigură transcrierea specifică a ADN fagic. În cazul infecției cu fagul T_7 al *E. coli*, inițial, ARN-polimeraza endogenă, bacteriană, a gazdei deci, transcrie circa 20% din ADN fagic, în partea stîngă a cromozomului fagului T_7 în care intră și gena 1 ce dirijează sinteza unei ARN-polimeraze specifice acestui fag cu GM = 10 000 daltoni. Această enzimă transcrie apoi restul ADN fagic (genele tîrzii). Structura ARN-polimerazei fagice este

Scanned with OKEN Scanner

simplă, reprezentînd un polipeptid mic de 1000 resturi aminoacizi, nefiind sensibilă la rifampicină. Rezultă că nici dimensiunea foarte mare și nici complexitatea structurală a ARN-polimerazei de *E. coli* nu sînt precerințe absolute pentru realizarea transcrierii înalt specifice a matrițelor ADN. Dar, spre deosebire de fagul T_7, fagul T_4 nu dirijează sinteza unei ARN-polimeraze specific fagice, ci o folosește pe cea a gazdei, pe care însă o modifică prin intermediul unui set de enzime ce alterează specificitatea funcțională a acesteia. Astfel, produsul unei gene fagice timpurii alterează miezul enzimatic al ARN-polimerazei gazdă, făcînd să înceteze transcrierea genelor timpurii ale fagului de către ARN-polimeraza bacteriană. În același timp, produșii altor gene timpurii, desemnate 33 și 35, se combină cu miezul enzimatic al ARN-polimerazei bacteriene, astfel că aceasta, fiind din nou modificată, capătă capacitatea de a recunoaște siturile de inițiere a transcrierii genelor tîrzii, prin înlocuirea subunității sigma gazdă cu două proteine specifice fagului, permițînd astfel declanșarea transcrierii genelor tîrzii.

La fagul λ transcrierea este realizată de enzima gazdă și dirijată de gena fagică N al cărei produs interacționează cu subunitatea β a ARN-polimerazei gazdă.

Transcrierea ADN λ apare ca un mecanism complex în care funcționează unități de transcriere, operoni și scriptoni specifici (Szybalski și colab., 1970, Szybalski, 1977).

5. **ARN-polimerazele eucariote.** Genele nucleare sînt transcrise de către trei tipuri de transcriptaze (Roeder și Rutter, 1970): ARN-polimeraza I se află în nucleol și catalizează sinteza de ARNr, nefiind inhibată de α-amanitină; ARN-polimeraza II se află în nucleoplasmă. Ea catalizează sinteza de ARN eterogen. Este inhibată de α-amanitină la concentrații mici; ARN-polimeraza III a fost izolată atît din nucleoplasmă, cît și din citoplasmă; ea catalizează sinteza ARNt și a ARN 5 S, fiind inhibată de α-amanitină numai la concentrații mari.

La plante, ARN-polimerazele au 6 subunități, numai ARN-polimeraza II de grîu are doar 4 subunități (Binding, 1977). Greutatea moleculară a celor trei categorii de ARN-polimeraze variază între 550 000 și 600 000 daltoni. ARN-polimerazele se sintetizează pe ribozomi citoplasmatici de unde sînt transferate în nucleu, încît localizarea lor în nucleu sau în citoplasmă are un caracter relativ. Ca și ARN-polimeraza bacteriană, enzimele eucariote (Chambon, 1974) au aceleași cerințe pentru reacția de transcriere: cele patru ribonucleozide trifosfat, ADN ca matriță, Mg^{2+} sau Mn^{2+}. Lungimea catenei ARN este în funcție de lungimea matriței copiate. Majoritatea, dacă nu toate, catenelor ARN sînt inițiate de ATP sau GTP. Viteza de transcriere este de 5—10 și chiar 30 nucleotide pe secundă. Se cunosc puține lucruri despre etapele procesului de transcriere la

Scanned with OKEN Scanner

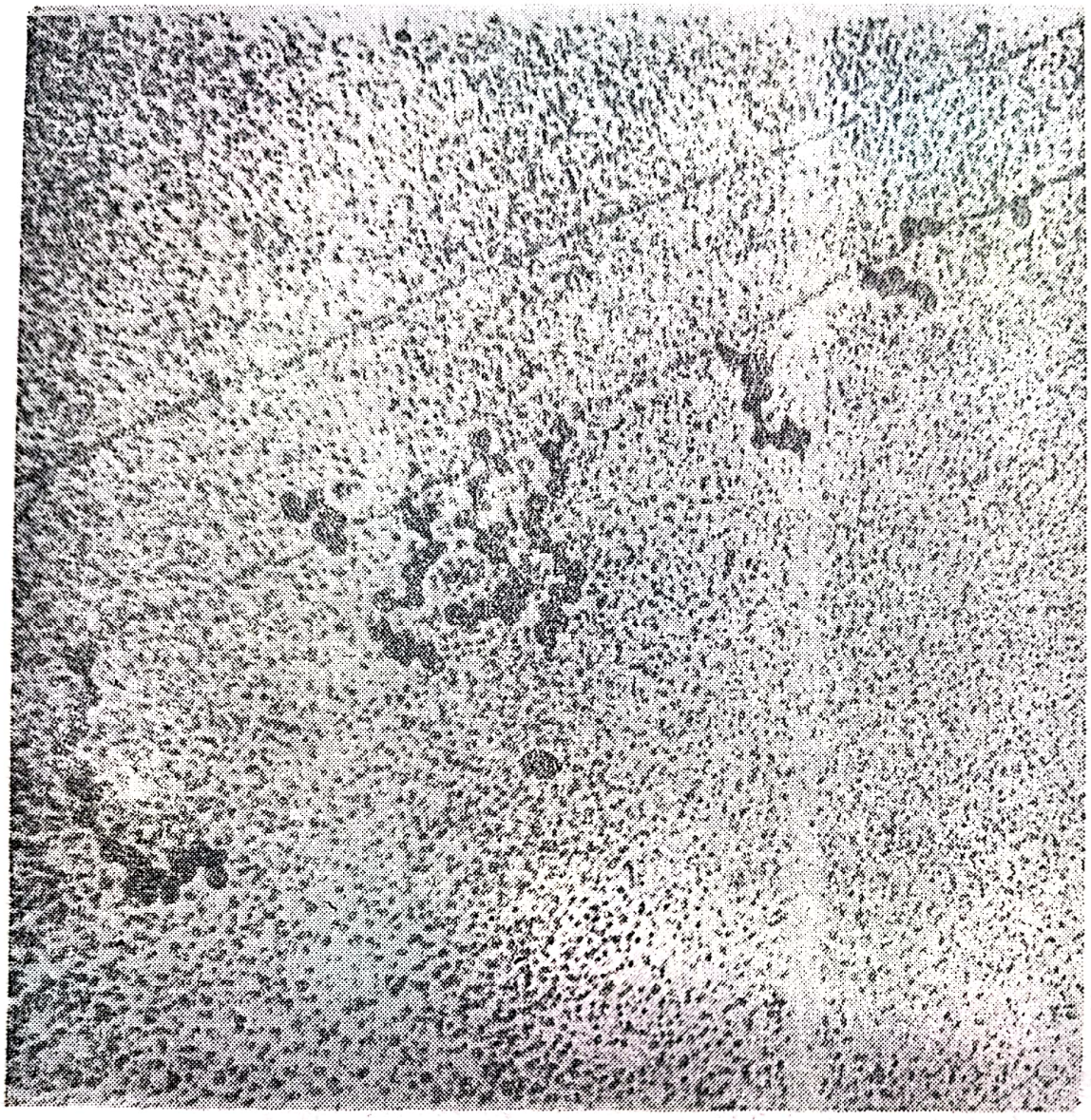


Foto VII — **Vizualizarea electronomicroscopică a transcrierii genetice la bacterii.** Se poate distinge catena activă (sens) în transcriere, la care sînt ataşate numeroase molecule de ARN-polimerază la nivelul punctului de iniţiere a transcrierii (extrema dreaptă). Se sintetizează molecule de ARNm de lungime crescîndă (gradient de lungime), aceea din extrema stîngă fiind terminalizată. Paralel cu transcrierea ADN şi ARNm, ribozomii se ataşează şi traduc mesajul genetic în proteine (după O. L. Miller, Jr., 1973).

eucariote, în special despre iniţierea şi terminarea catenei, eliberarea catenei ARN şi reiniţierea, ca şi despre rolul specific al variatelor subunităţi ale enzimelor. Nu este clarificată deocamdată problema existenţei unui factor de iniţiere la ARN-polimerazele eucariote. Ca şi la procariote (foto VII), transcrierea este asimetrică şi selectivă.

Transcrierea în celulele intacte la eucariote a putut fi evidenţiată prin marcare cu ^{3}H-uridină în sistemul politen (foto XVII) şi lamp-brush. Pufele şi inelele Balbiani reprezintă zona în care cromatina trece din starea compactă în starea difuză propice transcrierii genice. La nivelul heterocromatinei, cromatina se află în stare condensată,

Scanned with OKEN Scanner

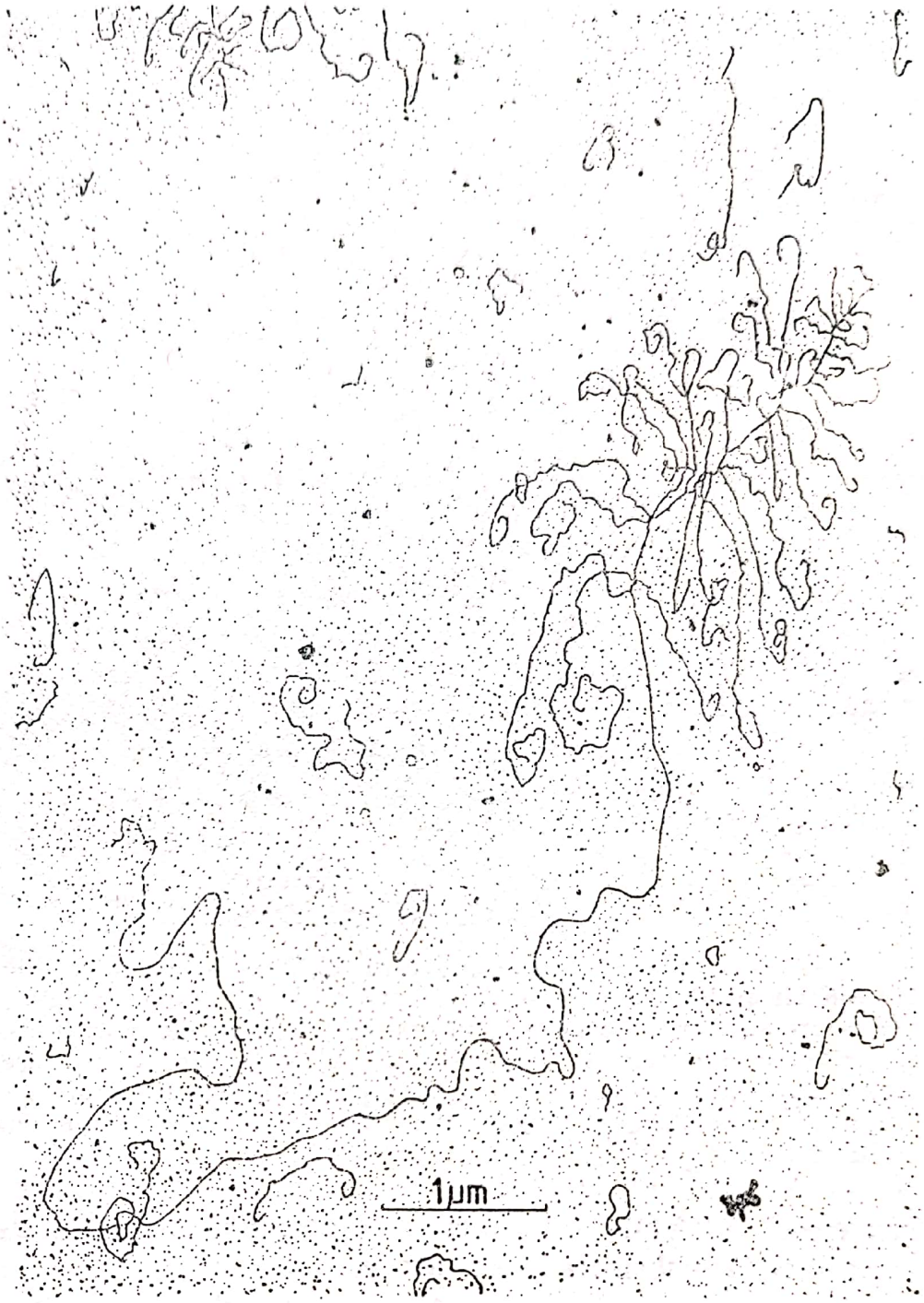


Fig. 27. Redesenare după o electronografie, prezentînd transcrierea in vitro a ADN al fagului T7. Acest complex de transcriere s-a format într-un amestec de reacție care conține molecule de ADN de fag T7 și molecule de ARN-polimerază în raport de 1 la 40, incubîndu-se cu nucleozid-trifosfați, la 37°C. Lungimea moleculei de ADN de fag T7 este de 40 kilobaze (după Delius, Westphal și Axelrod, „J. Mol. Biol.", 74, 680, 1973).

stare care face ca ADN să nu fie activ în transcriere. Transcrierea a fost evidențiată electronomicroscopic atît în sistemul procariot (fig. 27, foto VII), cît și în sistemul eucariot (foto VIII).

După datele de hibridare moleculară rezultă că la eucariote numai 5% din ADN este folosit ca matriță pentru sinteza ARN. Această

Scanned with OKEN Scanner

Foto VIII — **Transcrierea genelor pentru ARNr la nivelul nucleolilor extracromozomali din ovocitele amfibienilor.** Se poate remarca existența fibrelor axiale care prezintă atașate pe anumite segmente fibrile într-un gradient de lungime. Aceste fibrile reprezintă complexe ribonucleoproteinice. Segmentul de ADN pe care se află asemenea fibrile, care pornesc de o parte și de cealaltă a sa, reprezintă gena ribozomală care este transcrisă. Genele ribozomale active în transcriere sînt separate de regiuni inactive numite ADN spațiator.

„mascare" a ADN ca matriță reprezintă prin ea însăși un aspect al reglării transcrierii la eucariote.

La eucariote, nu se știe dacă are loc desfacerea locală a dublului-helix ADN în vederea transcrierii sau dacă acesta se realizează sub acțiunea directă a ARN-polimerazei sau a altor factori celulari.

La eucariote, ca și la procariote, deoarece prima bază din transcriptul ARN este o purină (A sau G), ribonucleozidtrifosfatul de inițiere fiind ATP sau GTP, s-a dedus, pe principiul complementarității, că prima bază din matrița ADN ce este transcrisă este o pirimidină (T sau C).

La eucariote în reglarea transcrierii, modificările în suprastructura ADN și în condensarea cromatinei au un rol important, ele fiind determinate prin acțiunea histonelor (în speță H_1) și a nonhistonelor (vezi organizarea genomului eucariot). Substanțele semnal cAMP, cGMP

Scanned with OKEN Scanner

și în special hormonii, modulează cantitativ pe alți factori sau interacționează direct cu proteinele reglatoare, activitatea genelor fiind determinată de starea lor inițială (competență) și caracterul citoplasmei. La plante, activitatea ARN-polimerazelor cade sub incidența funcțiilor reglatoare ale complexelor hormoni-proteine receptoare, printre care un rol decisiv în expresia genică îl au proteinele receptoare auxinice care prezintă specificitate de țesut și de matriță.

Mecanismele de reglare a transcrierii se bazează pe principii comune la procariote și eucariote (Khesin, 1978). Complexitatea enzimei bacteriene de transcriere sugerează roluri suplimentare îndeplinite de ea în reglarea transcrierii și replicării ADN (Travers, 1976), deoarece transcrierea ADN ca atare poate fi realizată și de o ARN-polimerază alcătuită dintr-o singură catenă polipeptidică, cum este cazul ARN-polimerazei induse de fagul T_7 sau ARN-polimerazei mitocondriale la eucariote.

Dacă se compară ADN-polimeraza I bacteriană cu ARN-polimeraza corespunzătoare (de *E. coli*) se constată că ele au aceeași necesitate pentru forma trifosfatică activată a nucleozidelor și pentru ioni bivalenți. ARN-polimeraza nu are capacitate de corecție a transcrierii, neavînd funcție reparatorie. Spre deosebire de ADN-polimeraze, ARN-polimeraza are capacitatea de a iniția sinteza ARN, de a recunoaște secvențe specifice din ADN și de a folosi ca matriță un ADN dublu-catenar.

6. **ARN celular.** Sînt trei categorii de ARN celular comune procariotelor și eucariotelor (ARNt, ARNr, și ARNm) și încă două categorii specifice doar eucariotelor — ARN nuclear eterogen și ARN cromozomal.

1. *ARN de transfer (ARNt).* Acest tip de ARN a mai fost numit ARN solubil — ARNs — (Hoagland și colab., 1958), fiind găsit în citosol. Are o GM = 25 000 daltoni, corespunzînd la 70—80 nucleotide. Are o constantă de sedimentare de 4S. Reprezintă adaptorul sau molecula de racordare la care se atașează diferiți aminoacizi în procesul de biosinteză proteinică. Poartă o secvență de baze azotate ce formează anticodonul care recunoaște în mod specific codonul din ARNm. În afara celor patru ribonucleotide fundamentale: A, U, G, C, prezintă în molecula sa un număr relativ mare de nucleotide minore, care derivă din cele majore prin diverse modificări enzimatice ce au loc după sinteza (transcrierea) sa de pe matrița ADN. Astfel, grupe metil pot fi adăugate fie la riboză, fie la bazele azotate sub cataliza unor enzime specifice — metilazele. Poziția bazelor metilate în macromolecula ARNt este foarte constantă (Venkstern, 1976). Cea mai frecventă componentă modificată este pseudouridina (ψ). Alte baze modificate sînt 1-metiladenozina (m_1A), 2-dimetilguanozina (m_2^2G), N^6 izopenteniladenozina (iA), inozina (I), 4-acetilciti-

Scanned with OKEN Scanner

dina (acC), 5, 6-dihidrouridina (DHU) etc. De asemenea, în ARNt intră și timina (T). Prezența grupelor metil interferă cu formarea oricăror perechi de baze complementare. În cazul acidului pseudouridilic, inelul pirimidinic uracil este atașat la riboză nu prin azotul său N—1 ca în cazul uracilului normal ci prin carbonul său C—5.

Acidul ribotimidilic (T) găsit în mod neobișnuit în ARNt reprezintă uracilul la al cărui C—5 a fost adăugat un grup metil. Dihidrouracilul (dihidrouridina) prezintă cîte un hidrogen suplimentar pe C—5 și C—6 din inelul său heterociclic. Acest inel nu este în realitate o pirimidină, deoarece legătura dintre C—5 și C—6 este o punte simplă nu una dublă.

Cum nucleotidele neobișnuite nu pot fi introduse în catena polinucleotidică a ARNt prin nici un mecanism de împerechere de baze complementare în timpul transcrierii, înseamnă că ele apar în urma convertirii nucleotidelor obișnuite, prezente deja în ARNt, sub acțiunea unor enzime specifice cum ar fi metilazele. Astfel, o enzimă specifică convertește grupul NH_2 — de la carbonul C—2 al acidului adenilic din ARNt în grupul —OH, creînd astfel un rest inosinic (I) la unele situri ale catenei ARNt precursoare. Grupul metil de la metionină al S-adenosilmetioninei poate fi transferat prin acțiunea transmetilazelor în poziții specifice ale inelului hipoxantinei, guaninei sau uracilului din ARNt, creînd baze metilate corespunzătoare. Alte enzime catalizează rearanjarea dintre inelul pirimidinic și riboză cu convertirea uracilului. în pseudouracil sau pot hidrogena inelul, convertind uracilul în dihidrouracil etc. Există în ARNt al tuturor organismelor un oligonucleotid universal G—T—ψ—C—G cu două componente deosebite T și ψ — care condiționează interacțiunea ARNt cu ARNr 5S din ribozom. El apare la eucariote, îndeosebi la ARNt inițiator al catenei polipeptidice.

a) *Structura primară a ARNt.* A fost pentru prima dată stabilită la ARNt care atașează alanina ($ARNt^{Ala}$) de drojdie, de către Holley și colab. (1965), folosind metode de secvențiere microanalitice și metoda fingerprint a lui Sanger și colaboratorii. Fragmentarea catenei $ARNt^{Ala}$ în fragmente mai mici s-a realizat cu ajutorul ribonucleazei pancreatice (taie catena polinucleotidică la capătul 3′ al tuturor nucleotidelor pirimidinice) și al ribonucleazei takadiastazice T_1 (care taie catenele polinucleotidice la partea 3′ a resturilor purinice guanină și hipoxantină).

S-au obținut 19 tipuri diferite de mononucleotide și 17 tipuri diferite de polinucleotide (1—8 resturi nucleotidice) care au fost separate prin cromatografie, iar secvența de nucleotide a fragmentelor separate a fost stabilită prin degradare progresivă, nucleotid după nucleotid, cu fosfodiesterază din venin de șarpe. Pe baza acoperirii de secvențe observată în cele două seturi de fragmente nucleotidice a fost reconstituită structura primară a $ARNt^{Ala}$ ca și a peste 60

Scanned with OKEN Scanner

tipuri diferite de ARNt, printre care: $ARNt^{Ser}_{I+II}$, $ARNt^{Tir}$, $ARNt^{Fen}$, $ARNt^{Val}$ la *Saccharomyces cerevisiae*; pentru ARNt pentru valină, izoleucină, tirozină la *Torulopsis utilis* (levură); tirozină, formilmetionină (ARNt inițiator), metionină, valină și fenilalanină la *E. coli* ca și la alte organisme. A fost de asemenea descifrată structura primară a ARNt izoacceptori și de inițiere ca și a ARNt care nu participă în sinteza proteinică, ci în aceea a peptidoglicanilor.

Recent s-a stabilit structura primară a ARNt pentru tirozină de la *Baccillus stearothermophilus* prin marcarea sa la capătul 5′ cu ^{32}P și digestie parțială cu RN-aza T_1 specifică pentru G, RN-aza U_2 specifică pentru A, RN-aza pancreatică specifică pentru C+U și RN-aza I din *Physarum polycephalum* care clivează la nivelul tuturor resturilor cu excepția lui C. Fracționarea digestelor pe gel acrilamidă denaturat și autoradiografia au permis stabilirea secvenței acestui ARNt (Simoncsits, 1977). Tot astfel a fost secvențiat ARNt pentru glicină la *Bombyx mori* (Garel și Keith, 1977). Compararea structurii primare a diferitelor tipuri de ARNt a permis desprinderea unor regularități structurale în localizarea bazelor minore ca și în distanțele ce separă anumite secvențe specifice, cum ar fi GTψ; DHU; tripleta terminală $CCA_{OH\text{-}3'}$. Macromolecula ARNt cuprinde mai multe regiuni: regiunea 5′-terminală (care se termină cel mai adesea cu nucleotida pG), regiunea dehidrouracilului, regiunea anticodonului (care la $ARNt^{Fen}$ de drojdie cuprinde o bază fluorescentă notată cu Y, reprezentînd un triplu heterociclu), regiunea a 4ª variabilă (3—13 nucleotide), regiunea a cincea comună tuturor tipurilor de ARNt, numită regiunea TΨC și regiunea a 6ª, la capătul 3′ al macromoleculei cuprinde 11 nucleotide avînd ca secvență terminală, comună tuturor tipurilor de ARNt trinucleotidul CCA_{OH}. Se sugerează că bazele minore ar avea rolul de a împiedica formarea de perechi de baze, păstrînd molecula de ARNt sub formă de structură primară, monocatenară la nivelul cărora rămîn grupări libere-cetonice și aminice, neangajate în formarea punților de hidrogen, permițînd interacțiunea ARNt cu ribozomul și cu alte macromolecule (ARNm, enzimele activatoare ale aminoacizilor).

ARNt este sintetizat sub formă de precursor macromolecular (Littauer și Inouye, 1973) numit pre-ARNt sau pro-ARNt, care nu conține baze metilate și uneori nici pseudouracil. Pre-ARNt este mai lung decît molecula sa matură (definitivă) cu 30—40 resturi nucleotidice, prezentînd o structură terțiară mai puțin compactă. Prelucrarea posttranscripțională a pre-ARNt este asemănătoare la procariote și eucariote (Binding, 1977), ducînd prin intervenția nucleazelor la formarea ARNt matur cu constanta de sedimentare 4 S. Catenele precursoare conțin uneori secvențe de nucleotide ce aparțin la diferite tipuri de ARNt sintetizate în tandem (una după alta). Catenele precursoare de ARNt au fost pentru prima dată descoperite la unii mutanți termo-

Scanned with OKEN Scanner

sensibili de *E. coli* care la temperatură nepermisivă sintetizează ARNt cu molecule mai lungi decît tipul normal.

S-a constatat că tipul normal de *E. coli* poate sintetiza o enzimă nucleazică numită RN-ază P care clivează moleculele precursoare de ARNt, ajustîndu-le la dimensiuni normale.

Capătul 5′ se păstrează intact în prelucrările posttranscripționale ale pre-ARNt, fiind pppGp. Sînt excizate, de asemenea, prin acțiunea ribonucleazelor, secvențele suplimentare din pre-ARNt, avînd loc totodată modificări în bazele rămase în special metilarea cu ajutorul enzimelor citoplasmatice metilaze (Söll, 1971). Trinucleotidul CCA_{OH} de la capătul 3′—, comun tuturor moleculelor ARNt, este adăugat cu ajutorul enzimei ARNt — nucleotidiltransferaza, după clivarea precursorului. Dar datele asupra acestui trinucleotid terminal sînt încă contradictorii; după unii autori, acest capăt 3′—OH CCA este transcris de pe ADN (Travers, 1976) și se află în pre-$ARNt^{Tir}$, de exemplu. Secvența $5'_pC_pC_pA$ 3′ este implicată în aminoacilarea ARNt (vezi sinteza proteinică). Îndepărtarea sa, sub acțiunea fosfodiesterazelor din venin de șarpe, distruge capacitatea ARNt de a accepta aminoacizi. Asemenea molecule de ARNt care și-au pierdut capacitatea acceptoare prin îndepărtarea trinucleotidului terminal CCA pot să-și recapete capacitatea acceptoare de aminoacizi dacă sînt puse într-un amestec de reacție *in vitro* în care se adaugă o enzimă specială — nucleotidiltransferaza de *E. coli* (cu capacitatea de a adăuga nucleotide terminale la o catenă polinucleotidică) și substraturile sale CTP și ATP. Se poate astfel demonstra că secvența CpCpA este adăugată posttranscripțional fără a se recurge la împerechere de baze complementare cu matrița ADN.

b) *Structura secundară a ARNt.* Acolo unde există posibilitatea unirii de baze complementare prin punți de hidrogen (două între A și U și trei între G și C) iau naștere porțiuni dublu-catenare care reprezintă structura secundară a ARN. Structura secundară apare într-o anumită conformație spațială pentru care s-au propus unele modele ipotetice. Cel mai cunoscut și acceptat totodată este modelul frunzei de trifoi, propus pentru prima dată de către Holley și colab. (1965) pentru $ARNt^{Ala}$ de la *S. cerevisiae*, și care se aplică și la celelalte ARNt. Modelul prezintă regiuni dublu-catenare, rezultate prin împerecherea de baze complementare și regiuni monocatenare care formează bucle (fig. 28). În cadrul modelului împerecherea începe cu prima bază a extremității 5′ și baza a cincea a extremității acceptoare 3′, care păstrează libere primele 3 nucleotide CCA. În afară de împerecheri de baze complementare, în cadrul structurii secundare a ARNt apar și asocieri neobișnuite de baze, cum ar fi G—U.

Regiunile cu bucle reprezintă regiunile cele mai reactive ale ARNt (Malcom, 1975). Modelul frunzei de trifoi nu poate explica toate proprietățile moleculelor ARNt. Macromolecula ARNt prezintă o confi-

Scanned with OKEN Scanner

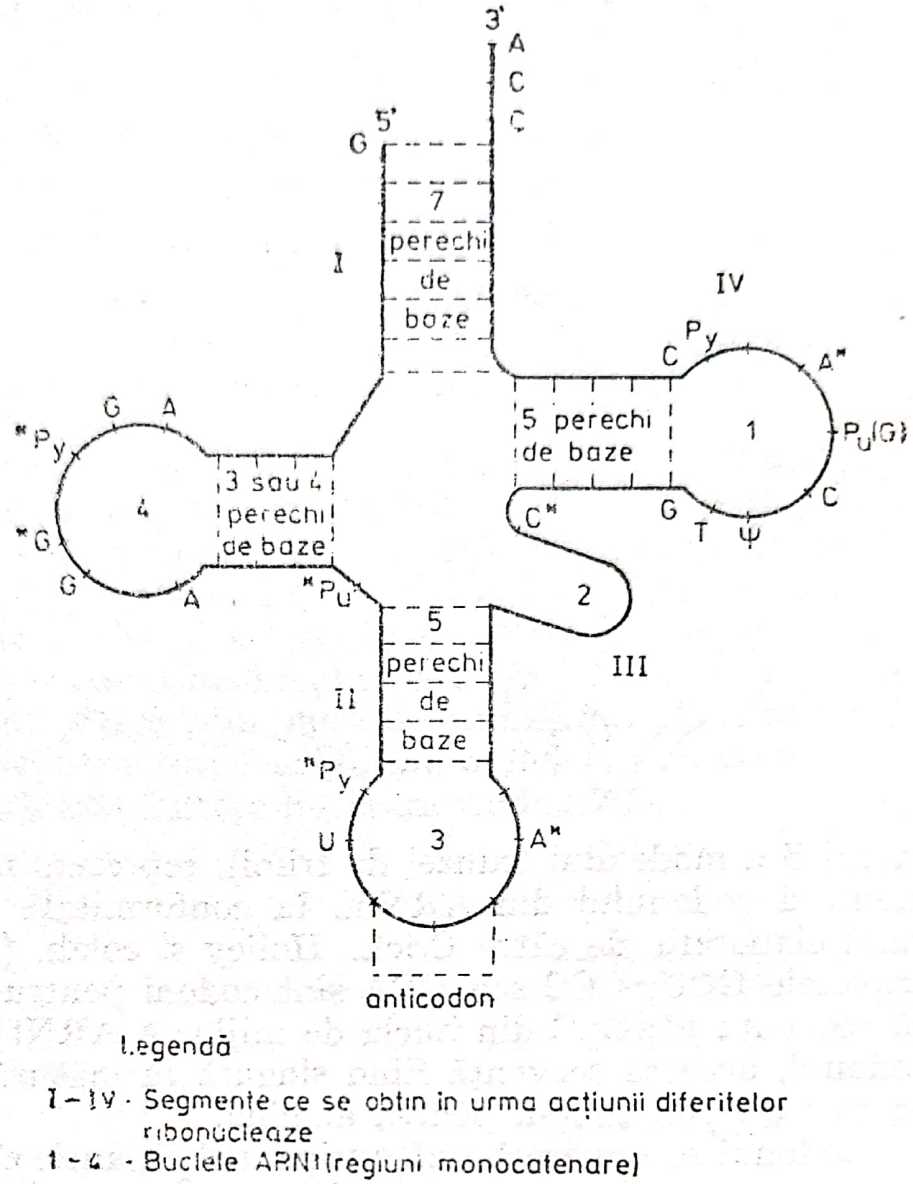


Fig. 28 — **Principalele caracteristici comune tuturor ARNt (modelul frunzei de trifoi).** Nucleotidele marcate cu asterisc se pot prezenta sub formă modificată.

gurație tridimensională mai compactă (fig. 29) decît aceea pe care ar putea s-o ofere modelul obișnuit al frunzei de trifoi. Această configurație prezintă două stări conformaționale reversibile, una nativă și activă biologic, și alta denaturată și inactivă. Proprietățile hidrodinamice optice și cromatografice ale celor două stări sînt diferite.

Cristalizarea ARNt a permis cercetarea structurii sale prin metode fizice, cum ar fi difracția în raze X. Cristalizarea mai multor tipuri de ARNt a permis evidențierea unei structuri cristaline uniforme care prezintă diagrame de difracție în raze X corespunzătoare unui cristal unic, ceea ce indică un grad înalt de similitudine între diferitele tipuri de ARNt, la nivelul structurii terțiare. Rolul regiunilor distincte ale moleculei ARNt nu este în totalitate precizat. Cea mai certă este funcția anticodonului (tripleta din bucla centrală — bucla nu-

Scanned with OKEN Scanner

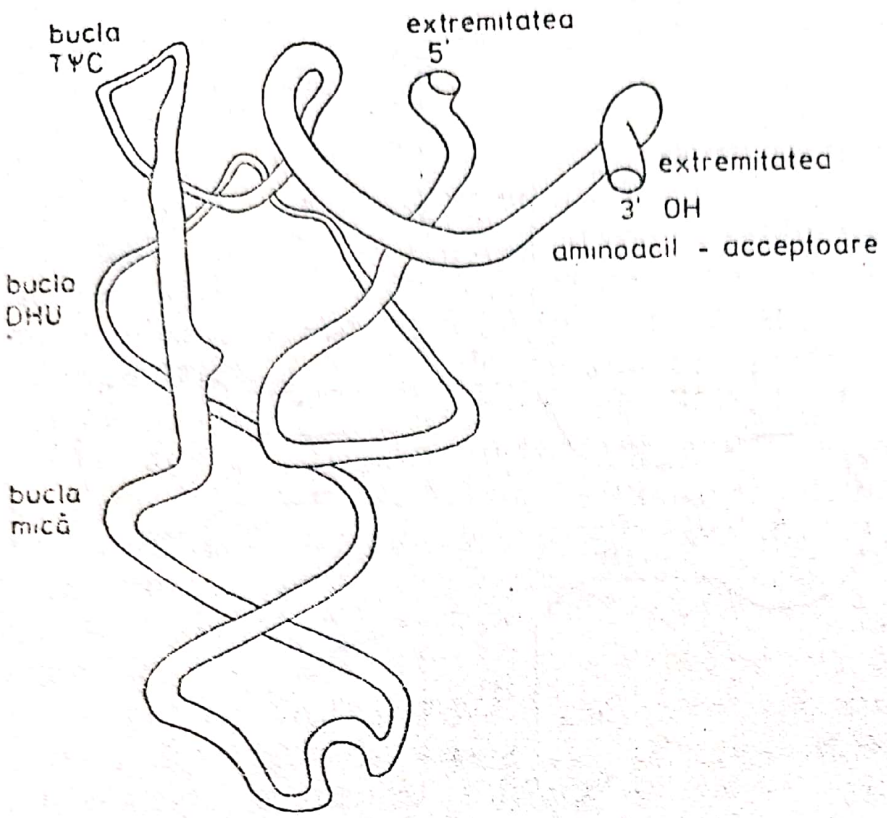


Fig. 29. Modelul spațial al ARNt de la drojdie pentru fenilalanină.

mărul 3 a modelului frunzei de trifoi), reprezentînd secvența complementară codonului din ARNm, în conformitate cu ipoteza adaptorului elaborată de către Crick. Holley și colab. (1965), cunoscînd că tripletele GCU, GCC sau GCA sînt codoni pentru alanină, au dedus că secvența pIpGpC din bucla de mijloc a $ARNt^{Ala}$ reprezintă anticodonul, această secvență fiind singură în măsură să se împerecheze cu toți cei trei codoni pentru alanină.

Codonul se împerechează antiparalel cu anticodonul prin formarea unor legături temporare de hidrogen. Împerecherea celei de-a treia baze din anticodon și codon poartă un caracter oscilant *(wobbly)* putînd avea loc împerecheri dintre mai multe baze I, U, C, A pe de o parte și G, U, C, pe de alta.

Rolul anticodonului a fost demonstrat cu ajutorul unor ARNt supresori de la *E. coli* în care G* din anticodonul G*UA este înlocuit cu C. Aceasta face ca un codon de terminare a catenei polipeptidice, cum este codonul UAG din ARNm, să fie citit de ARNt ca un codon pentru tirozină (CUA) și sinteza proteinică să se continue, desigur însă în mod anormal.

Informațiile experimentale privind rolul sitului de fixare a ARNt la ribozom (atribuit buclei numărul 1) și al sitului de recunoaștere a ARNt de către enzimele aminoacil-ARNt-sintetaze — (AA-ARNt--sintetaze) atribuit buclei numărul 4 a dihidrouracilului — (Ebel, 1972, Dudock și colab., 1971), sînt aproape inexistente.

Secvența terminală $3'—CCA_{OH}$ reprezintă situl de legare a aminoacidului activat, specific fiecărui ARNt. Dat fiind faptul că secvența

Scanned with OKEN Scanner

CCA este comună tuturor ARNt, fixarea aminoacidului la aceasta nu implică specificitate. Necesitatea prezenței la capătul 3' a unui rest adenilat rezultă din experiențele de îndepărtare cu periodat a adenozinei din secvența CCA, în care caz nu mai are loc atașarea aminoacidului. Regiunile neîmperecheate (DHU și regiunea variabilă) au fost implicate în recunoașterea specifică a AA-ARNt-sintetazelor. Mai există și alte situri specifice pe macromolecula ARNt, cum ar fi situl de interacțiune cu factorii de inițiere sau elongare a catenei polipeptidice sau situri de interacțiune cu diverse enzime (ARNt-CCA-pirofosforilaza, metilaza, transformilaza etc.), despre a căror localizare nu există date.

Recent a fost elaborat un model de structură tridimensională a ARNt pentru fenilalanină de la drojdie (fig. 29, 30) de către Kim și colab. (1973), care prezintă caracteristici diferite față de modelul „clasic" al frunzei de trifoi. Acest fapt s-a bazat pe studii de difracție în raze X a soluțiilor pure de ARNt și a cristalelor ARNt (Blake și colab., 1970) care ar fi în acord cu un model al unei frunze de trifoi cu patru foi în care brațele sînt prinse prin punți de hidrogen în jurul brațului CCA, cu formarea unei structuri baciliforme avînd la o extremitate situl CCA și la cealaltă extremitate bucla anticodonului.

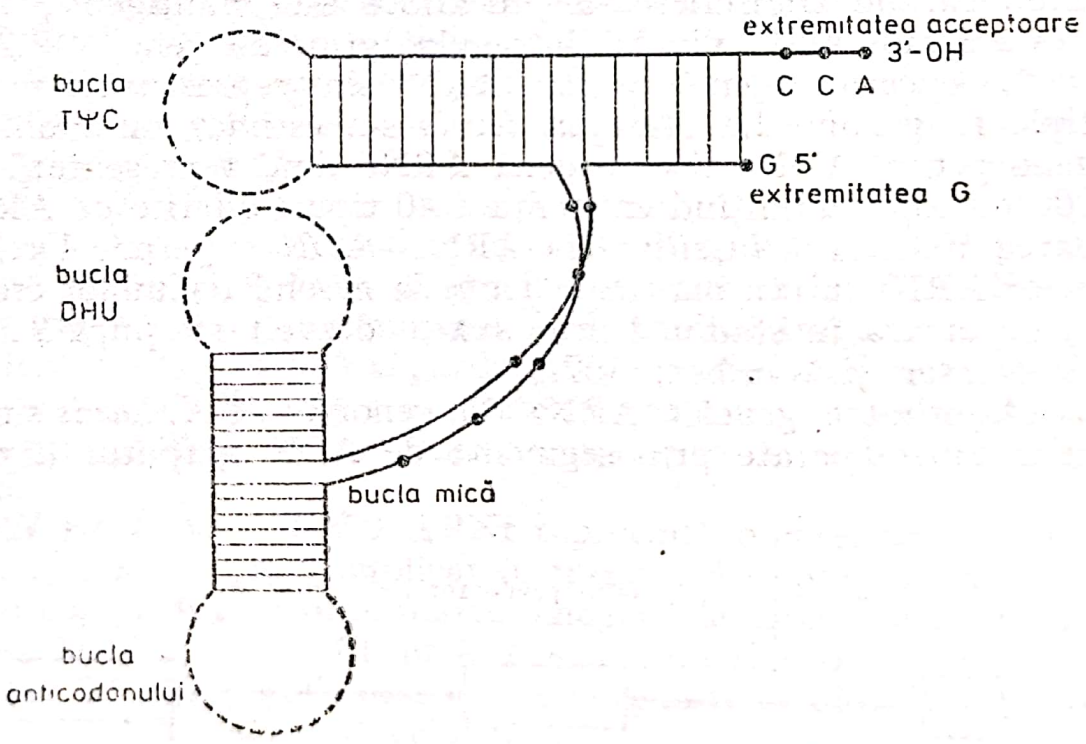


Fig. 30. **Modelul molecular cu două regiuni dublu-elicoidale dispuse în unghi drept,** pentru configurația tridimensională a ARNt pentru fenilalanină de la drojdie, arătîndu-se cum modelul frunzei de trifoi poate fi transformat spre a se păstra legăturile fizice dintre variatele părți ale moleculei (după Goodenough și Levine, 1974).

Scanned with OKEN Scanner

c) *Informația genetică pentru sinteza ARNt.* Studii genetice (Smith, 1972) de hibridare ADN-ARNt și de transcriere *in vitro* au demonstrat transcrierea ARNt de pe segmente din ADN ce dețin informația genetică pentru sinteza diferitelor tipuri de ARNt, segmente care reprezintă ADNt. Se apreciază la *E. coli* un număr de 30—40 gene, iar la eucariote 60 gene pentru ARNt. La drosofilă s-au estimat 13 copii pentru fiecare tip de ARNt. La *E. coli* genele pentru ARNt nu sînt în copii multiple. Studiul mutantelor ARNt arată că genele pentru acest ARN sînt dispersate în tot genomul bacterian (Littauer și Inouye, 1973), uneori fiind grupate cîte 3—4 ca la *E. coli*, separate fiind de regiuni spațiatoare de 30—40 nucleotide. Genele ARNt pentru glicină, tirozină și treonină fac parte dintr-o unitate de transcriere, fiind transcrise simultan, în bloc, fiind dispuse în tandem pe cromozomul bacterian. Studiul electronomicroscopic al heteroduplexului rezultat din ADN fagului transductant λh 80 H (care poartă un segment din cromozomul de *E. coli* ce conține genele celor trei tipuri de ARNt) și ADN fagului defectiv pentru aceste gene — desemnat λh 80 T — a permis stabilirea ordinii și distanței în nucleotide dintre cele trei gene: $ARNt^{Tre}$ — 260 — $ARNt^{Tir}$ — 140 — $ARNt^{Gli}$, produșii de transcriere a acestor trei gene fiind sintetizați în cantități egale. Gena ARNt pentru glicină se află în genom în trei copii, existînd trei $ARNt^{Gli}$ izoacceptori: $ARNt1^{Gli}$, $ARNt2^{Gli}$, și $ARNt3^{Gli}$. Produsul de transcriere la procariote este multigenic, transcrierea desfășurîndu-se la nivelul întregului grup de gene.

La eucariote genele pentru ARNt sînt reprezentate în copii multiple în genom. La *Xenopus laevis* s-a estimat un număr de 8000 gene pentru ARNt, fiecare genă ARNt fiind reprezentată prin circa 200 de copii, admițînd existența a 40 tipuri diferite de ARNt. Hibridarea moleculară *in situ* ^3H—ARNt—ADN a permis localizarea genelor ARNt în cea mai mare parte la nivelul regiunilor cromozomale care pufează în stadiul larvar sau în dezvoltarea pupală a drosofilei (Steffensen și Wimber, 1971).

Majoritatea genelor ARNt din genomul de *X. laevis* sînt aranjate în blocuri separate prin segmente de ADN spațiator (fig. 31) care

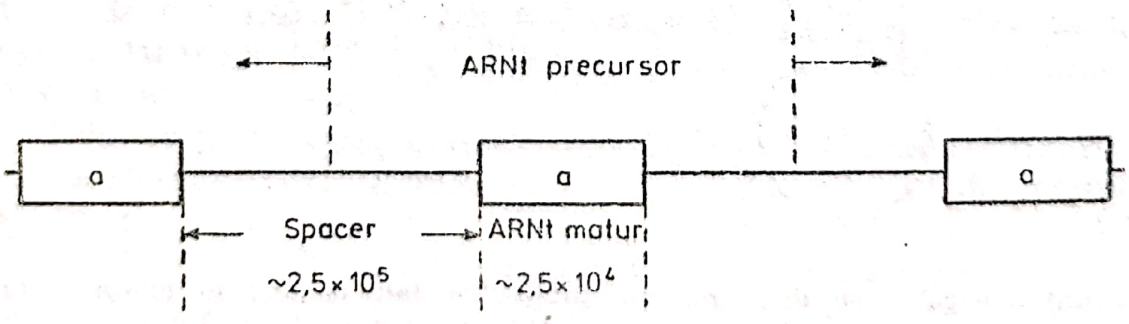


Fig. 31. Modelul de organizare a genelor ARNt la Xenopus laevis (după Clarkson și Birnstiel, 1973).

Scanned with OKEN Scanner

sînt uniforme și au un conținut GC mai sărac față de secvențele genice propriu-zise.

Cu trecerea de la procariote la eucariote se mărește numărul general de gene ARNt, pe seama măririi numărului de copii avînd loc totodată mărirea lungimii segmentelor spațiatoare. Aceste segmente spațiatoare ar putea fi legate de reglarea transcrierii genelor ARNt adiacente. În laboratorul lui Khorana a fost sintetizată pe cale chimică gena pentru $ARNt^{Ala}$ de drojdie (Agarwal și colab., 1970). Sinteza ARNt *in vitro* s-a bazat pe folosirea ADNt de la fagul transductant Φ 80 psu III ce poartă gena pentru $ARNt^{Tir}$, ADN al fagului λ purtător a trei gene ARNt și ADN de fag T_4 ce poartă opt gene ARNt. În sisteme acelulare se obțin transcripte ce se separă prin gel-electroforeză. Pe această cale s-a descifrat structura regiunilor spațiatoare din ADNt, care nu sînt transcrise.

d) *Reglarea biosintezei ARNt.* În celulele ce sintetizează masiv proteine specifice, populația de molecule ARNt este corelată cu populația de aminoacizi specifici acestor molecule de ARNt. De exemplu, în reticulocite se află concentrații mari de ARNt pentru izoleucină și metionină, acești aminoacizi fiind abundenți în catena β a hemoglobinei. Aceasta arată că în transcriere există o anumită specificitate, determinată de țesut. Conținutul ARNt este variabil în diferite etape ale embriogenezei și diferențierii. Transcrierea cade, de asemenea, sub incidența controlului hormonal (ecdizonul — hormon de împupare la insecte — stimulează activitatea de matriță a ADN la nivelul pufelor cromozomilor politeni, iar hormonii de creștere, hidrocortizonul și estradiolul stimulează transcrierea). Fitohormonii influențează chiar structura ARNt. La mazăre, în bucla anticodonului din ARNt pentru leucină se află ciszeatina (ribozilcitokinină) care se împerechează cu uridina din codon (Binding, 1977). ARNt pentru leucină este degradat specific de un factor aflat în leucil-ARNt-sintetază, iar infectarea *E. coli* cu fagul T_4 determină fragmentarea specifică a ARNt pentru leucină al gazdei prin acțiunea unei ribonucleaze indusă de fag. Are loc blocarea sintezei proteinice în celula gazdă. Bacteriofagul Qβ duce la descreșterea specifică a legării $ARNt^{Pro}$ la ribozom.

2. *ARN ribozomal (ARNr).* ARNr reprezintă o categorie de ARN celular care, nefiind direct implicat în transferul informației genetice, prezintă o compoziție în baze foarte omogenă la diferitele organisme. (Attardi și Amaldi, 1970). El intră în structura ribozomilor reprezentînd pînă la 50—60% din masa acestor organite și pînă la 80% din conținutul total de ARN al celulei.

a) *Ribozomii.* Sînt particule ribonucleoproteinice electronodense, mai mult sau mai puțin sferice (foto IX și X) cu diametrul de 100—350 Å, ce conțin circa 40% proteine ribozomale și 60% ARNr. Se află în stare liberă sau atașați la reticulul endoplasmic. Joacă rol vital în

Scanned with OKEN Scanner

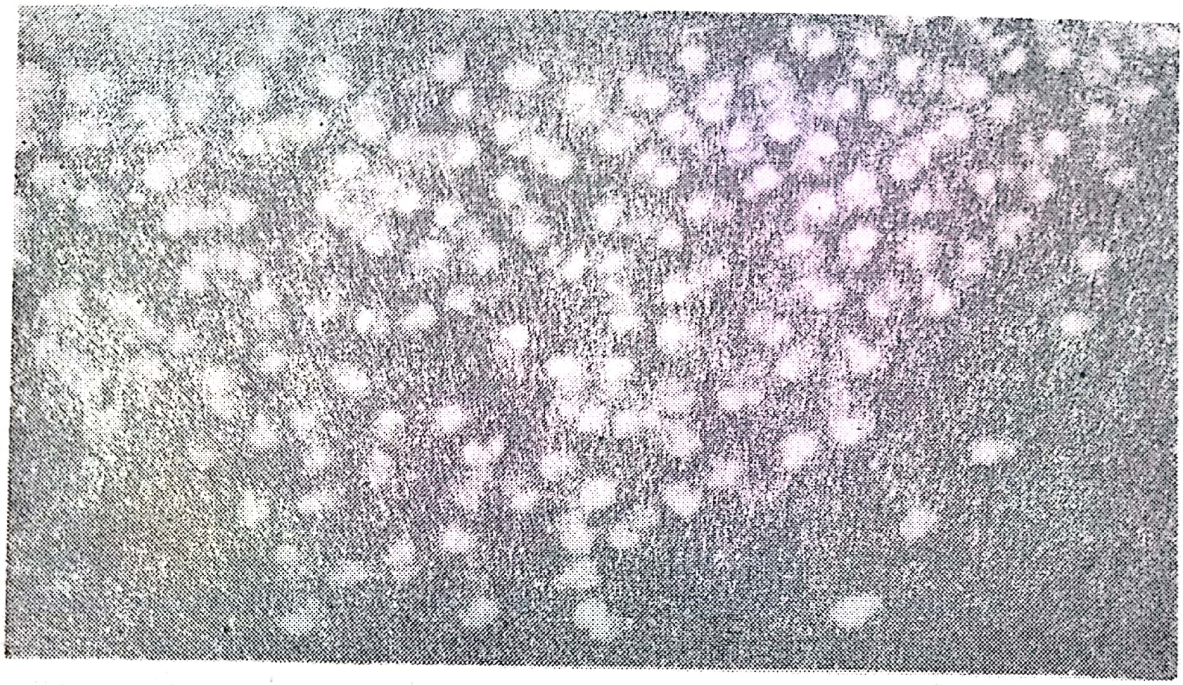


Foto IX — **Ribozomi de tip procariot—70S—**, negativ colorați cu acid fosfotungstic. Fiecare particulă este compusă din două subunități inegale, 50S și 30S. Unele particule ribozomale apar ca dimeri 70S (după Huxley și Zubay, 1960).

sinteza proteinică, atașîndu-se la catena ARNm și formînd poliribozomi (De Man și Noorduyn, 1969). La eucariote sînt două tipuri de ribozomi, citoplasmatici (citoribozomi) și ribozomii din organite (mitocondrii și cloroplaste). De asemenea, la eucariote ribozomii citoplasmatici alcătuiesc două populații (liberi și atașați la reticulul endoplasmic) care sintetizează seturi diferite de proteine. Una dintre funcțiile ribozomilor atașați la membrane este de a sintetiza proteine ce vor fi exportate din celulă, ele fiind eliberate prin membrană (Unwin, 1977). La procariote există un singur tip de ribozomi. Diferitele tipuri de ribozomi se deosebesc după constantele de sedimentare, avînd însă la toate organismele o structură comună, fiind alcătuiți din două subunități ribonucleoproteinice cu constante de sedimentare diferite.

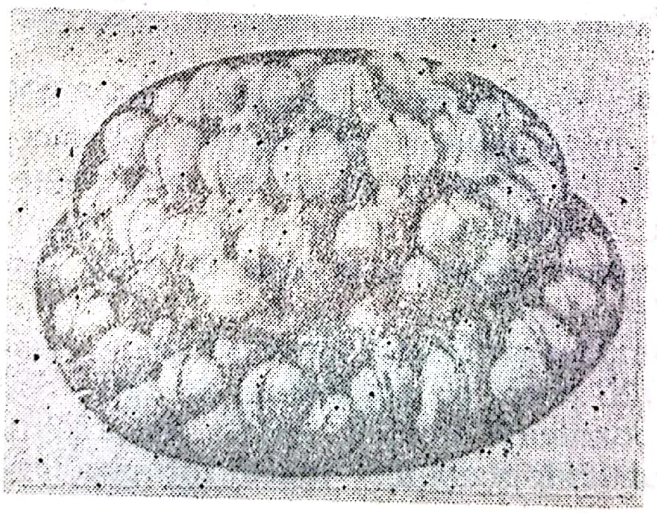


Foto X — **Un model spațial al ribozomului.**

Scanned with OKEN Scanner

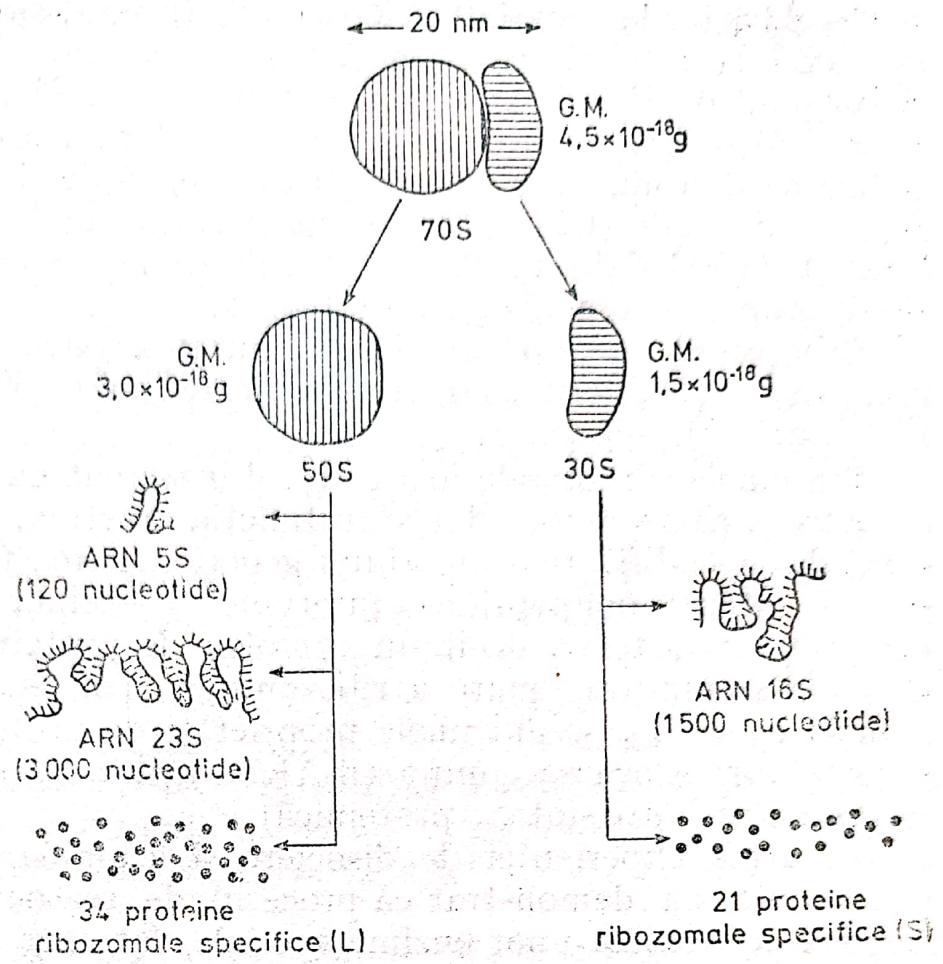


Fig. 32. **Reprezentarea schematică a ribozomului de E.coli** (modificat după Stent şi Calendar, 1978).

În gradient de sucroză, ribozomii procariotici (fig. 32) prezintă o constantă de sedimentare de 70 S (la *E. coli* — 69,1; la cianobacteria *Anabaena* — 71,6), pe cînd cei eucariotici au o constantă de sedimentare de 80 S (la *Euglena gracilis* — 86 S, în celulele HeLa 74 S, la mazăre, fasole şi drosofilă — 80 S). Ribozomii din organite sînt de tip procariot avînd o constantă de sedimentare de circa 70 S (în mitocondriile de ciuperci 77 S; în mitocondriile animale 60 S).

O celulă bacteriană în creştere are circa 10 000—30 000 particule ribozomale. Populaţia de ribozomi din celulele aceluiaşi organism sau ale unui organism monocelular este eterogenă. Ribozomul prezintă o subunitate mare (50 S) şi o subunitate mică (30 S). Ribozomul disociază în cele două subunităţi prin scăderea concentraţiei de ioni de magneziu pînă la 0,5 mM. Prin ridicarea acesteia se reasamblează particule ribozomale funcţionale din subunităţile sale.

Dacă la procariote subunitatea mică este de tip 30 S, iar subunitatea mare este 50 S, la eucariote subunitatea mică este 40 S, iar subunitatea mare este 60 S. În fiecare subunitate intră tipuri specifice de ARN ribozomal. În subunitatea mică intră la procariote ARNr 16 S, iar la eucariote ARNr 18 S. În subunitatea mare intră la procariote

Scanned with OKEN Scanner

ARNr 23 S iar la eucariote ARNr 28 S. În plus, subunitatea mare mai cuprinde la procariote ARNr 5 S și la eucariote ARNr 5 S și 7 S. Ribozomul de *E. coli* are în subunitatea mică 21 proteine ribozomale notate S1—S21, a căror greutate moleculară variază între 10 700 și 65 000 de daltoni, iar în subunitatea mare, 34 de tipuri diferite de proteine ribozomale (L1—L34) a căror greutate moleculară variază între 9000 și 28 500 daltoni. Proteinele ribozomale S pot fi fracționate în două grupe, una acidă și alta bazică.

Ribozomul eucariot are în subunitatea mică 32 proteine ribozomale (S_1—S_{32}) diferite, iar în subunitatea mare 39 tipuri de proteine ribozomale (L_1—L_{39}).

Proteinele ribozomale joacă un rol însemnat nu numai în structura ca atare a ribozomului, dar și în funcția acestuia, intervenind în procesul de decodificare a mesajului genetic. Astfel, în procesul de alungire a catenei polipeptidice intervine și enzima peptidiltransferaza care nu este altceva decît un complex de proteine ribozomale „L", deci din subunitatea mare a ribozomului. Tot astfel, proteinele ribozomale L_7 și L_{12}, avînd unele proprietăți de proteine contractile, facilitează translocarea aminoacil-ARNt-urilor în siturile specifice ale ribozomului (vezi sinteza proteinică).

În urma experienței de disociere și asamblare a componentelor ribozomale s-a demonstrat că procesul de reasociere a acestora nu implică activitatea unor enzime speciale, întreaga specificitate a procesului fiind inclusă în structura ARNr și a proteinelor ribozomale, fiind deci vorba de un proces de autoasamblare, proteinele ribozomale recunoscînd situri specifice ale ARNr (Nomura, 1970). *In vivo* se remarcă un ciclu ordonat al ribozomului cerut de procesul de biosinteză proteinică. În cadrul acestui proces, după ce ribozomii au parcurs o moleculă de ARNm aceștia se disociază în subunitățile lor, rămînînd în această stare de disociere cît timp nu are loc sinteza de proteine. Cînd se sintetizează o moleculă de ARNm purtătoare a unui mesaj genetic la ea se atașează, în anumite puncte specifice, subunitățile ribozomale mici — 30 S (Nomura și Lowry, 1967), după care, prin procesul de autoasamblare, se vor atașa și subunitățile mari (50 S) constituindu-se astfel particule ribozomale active în sinteza proteinică. Există, de asemenea, un ciclu de schimbări conformaționale ale ribozomului în care are loc trecerea reversibilă de la forma activă la cea inactivă. Asocierea de subunități ribozomale în formarea unui ribozom funcțional este aleatorie, particulele ribozomale schimbîndu-și reciproc subunitățile, după fiecare ciclu de sinteză polipeptidică. Legarea subunităților 30 S doar într-un anumit sit la macromolecula ARNm, pe o lungime din aceasta ce corespunde la 30 nucleotide, se bazează pe existența în ARNm de regiuni monocatenare, cu secvențe specifice. După inițierea catenei polipeptidice ribozomul vine în contact și cu celelalte regiuni ale ARNm inaccesibile în momentul inițierii. Legarea

Scanned with OKEN Scanner

subunităților 30 S la ARNm este condiționată de un factor de inițiere de natură proteinică (F_3) cu GM = 30 000. Odată atașată la ribozomi, molecula de ARNm este citită mai întîi la extremitatea sa 5′, aceea care este prima sintetizată. Un ribozom se atașează la ARNm la capătul 5′ chiar înainte de a fi încheiată sinteza întregii catene ARNm. Deplasarea ribozomilor pe ARNm se face în sensul 5′ → 3′, acesta fiind și sensul decodificării informației genetice în timpul biosintezei proteinice. Stabilitatea complexului de biosinteză proteinică se bazează pe punțile formate între ARNr, ARNt, ARNm, prin intermediul ionilor de Mg^{2+}. Cînd mai mulți ribozomi (5—6 pînă la 40, dispuși la o distanță de 5—10 nm) se atașează la catena ARNm se formează o structură multiribozomală numită *ergozom*, *poliribozom* sau *polizom*. Aceste complexe polizomale sînt active în sinteza proteinică celulară. Ele pot fi libere în citoplasmă sau atașate reticulului endoplasmic prin intermediul subunităților mari ale ribozomilor.

Reciclarea subunităților necesită un factor de inițiere numit încă și factor de disociere ribozomală. Acesta menține poliribozomii, în timpul traducerii mesagerului, inhibă asocierea subunităților ribozomale cînd nu există mesager, facilitează participarea subunităților mari la formarea polizomilor, permite acumularea de subunități ribozomale, prevenind formarea ribozomilor izolați și este cerut de atașarea ribozomilor la ARNm.

Procesul de biogeneză a ribozomilor este complex, fiind reglat în funcție de necesitățile fiziologice ale celulei și influențele factorilor de mediu. Proteinele ribozomale apără ARNr de atacul ribonucleazelor. Asocierea ARNr-proteine ribozomale are la bază și caracterul bazic al acestora din urmă, prin care sînt neutralizate grupările acide din ARNr.

La eucariote proteinele ribozomale sînt sintetizate în citoplasmă și migrează în nucleu la nivelul nucleolului, unde se află genele pentru ARNr și unde probabil are loc asamblarea particulelor ribozomale care apoi sînt trecute în citoplasmă ca particule ribozomale mature. Se presupune că ARNr posedă *in vivo* un mesaj tradus pentru sinteza proteinelor ribozomale.

La procariote sinteza componentelor ribozomale și asamblarea acestora se desfășoară simpatric. În timpul asamblării subunităților ribozomale sînt adăugate treptat la ARNr, într-o ordine specifică, proteinele ribozomale libere formînd particule ribonucleoproteinice care vor deveni ribozomi maturi. La unele mutante de *E. coli* este afectat mecanismul autoasamblării. Asemenea mutante sînt condițional letale căci ele cresc normal al 37 °C, dar mor la 20 °C.

Structura proteinelor ribozomale stă la baza rezistenței microorganismelor la multe antibiotice. În cazul organismelor producătoare de antibiotice, cum este *Streptomyces azureus*, care produce tiostreptonul ce inhibă sinteza proteinică la procariote, apărarea împotriva

Scanned with OKEN Scanner

propriei toxine se realizează prin metilarea ARNr 23 S din subunitatea 50 S sub acțiunea unei metilaze, din care cauză propriul tiostrepton nu se poate atașa la asemenea ribozomi (Cundliffe, 1978).

„Împachetarea" ribonucleoproteinică la nivelul ribozomilor împiedică pătrunderea ribonucleazei în interiorul acestora. Complexul ribonucleoproteinic se bucură de o anumită mobilitate conformațională, ceea ce îi permite să funcționeze ca sediu în sinteza proteinică în care este necesară deplasarea pe matriță a ribozomului, pătrunderea adaptorului, translocarea ribozomală etc. Există și unele date după care cel puțin în unele cazuri (proteina S_4) însuși ARNr deține codificată informația pentru sinteza proteinelor ribozomale (Ninio, 1978), avînd în acest caz și rol de ARNm. Ribozomii joacă un rol activ în controlul eficienței de recunoaștere de către anticodonul din ARNt a codonului din ARNm, existînd în ARNt un sit de atașare la ribozom. Nefiind purtător de mesaj genetic, ARNr are ca funcție esențială (conferită particulei în care el intră ca parte componentă principală — ribozomul) de a orienta ARNt și ARNm de așa manieră, încît anticodonul din ARNt să poată recunoaște codonul corespunzător din ARNm, condiționînd astfel o citire corectă a mesajului genetic purtat de ARNm. Pentru aceasta, ribozomul posedă suprafețe specifice de legare în poziții stereochimice a ARNm, ARNt și a lanțului polipeptidic în creștere (vezi biosinteza proteinică).

Deși intens studiați electronomicroscopic și biochimic, ribozomii mai prezintă încă neclarificate multe aspecte de structură și funcție. Prin descoperirea fenomenului de cristalizare a ribozomilor *in vivo* în celulele embrionului de găină, în urma separării ARNm de ribozomi, se întrezărește posibilitatea obținerii de cristale ribozomale *in vitro*. Cercetările de cristalografie ar permite obținerea unor date definitorii în elucidarea structurii și funcției ribozomilor.

b) *ARNr de greutate moleculară mică. ARNr 5 S* a fost descoperit în 1964 fiind legat de subunitatea ribozomală mare atît la procariote, cît și la eucariote, căreia îi condiționează capacitatea de a funcționa în sinteza proteinică. Studiat prin electroforeză bidimensională, s-a constatat că este alcătuit din 120 nucleotide atît la *E. coli* (Brownlee și colab., 1967), cît și în celulele KB (fig. 33). Este sintetizat sub forma unui precursor care nu este supus unor prelucrări posttranscripționale notabile și care nu suferă modificări chimice. Există diferențe în secvența ARN 5 S din ovocite și din celulele somatice, dar nu este înțeleasă semnificația funcțională a acestor diferențe (Ford, 1978). Raportul G + C/A + U în ARN 5 S este supraunitar. ARN 5 S de la procariote și eucariote are un precursor ancestral comun, ipoteză bazată pe marea omologie dintre molecule ARN 5 S de la procariotele și eucariotele actuale, precum *E. coli* și *Xenopus* (Brown și colab., 1971). Ca rezultat al duplicației genice a rezultat regiunea din ARN 5 S cuprinsă între resturile 10 și 60, respectiv 61 și 110, care pre-

Scanned with OKEN Scanner

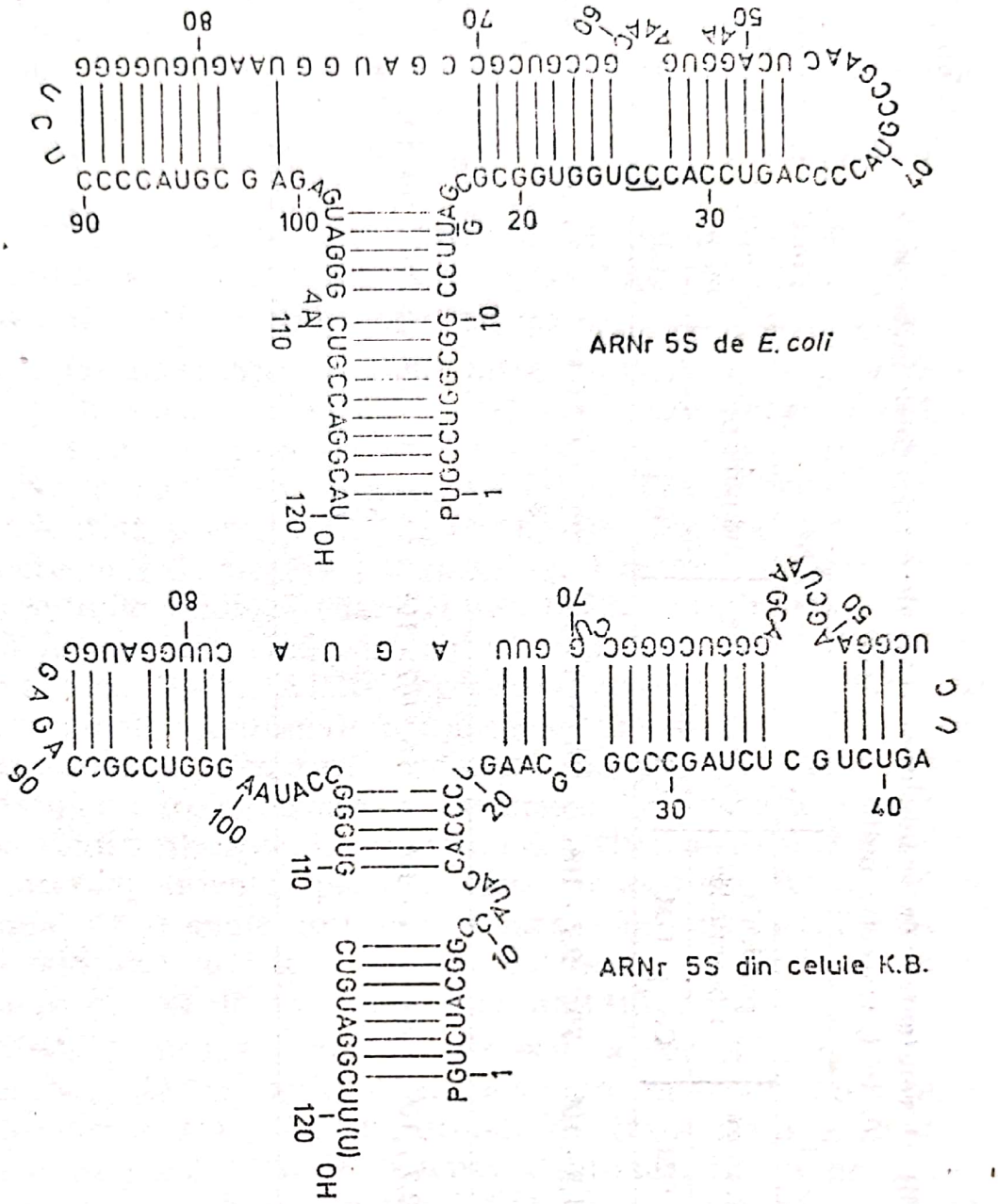


Fig. 33. **ARN 5S din E.coli şi celulele KB.**

zintă secvenţe repetate de nucleotide. ARN 5 S prezintă o structură secundară pe baza împerecherilor de baze care oferă posibilitatea realizării unei structuri tridimensionale complexe.

ARNr 7 S. Prezintă o lungime a catenei de 130 nucleotide, legîndu-se de ARN 28 S de la ribozomii mamiferelor (Davidson, 1972) prin punţi de hidrogen. Este sintetizat în nucleol şi apare ca cel de-al treilea produs de disociere a moleculei precursoare a ARNr de mamifer ce are o constanţă de sedimentare 47 S. ARN 7 S nu este metilat.

c) *ARNr de greutate moleculară mare.* Prezintă constantele de sedimentare 16 S şi 24 S pentru procariote şi 18 S respectiv 28 S la eucariote. La aceste tipuri de ARNr s-au făcut determinări globale

Tabelul 5

Greutatea moleculară (GM) şi constantele de sedimentare (CS) ale componentelor ribozomale
(daltoni, respectiv unităţi Svedberg)

Tipul de organizare	Ribozomi						ARNr				Proteine ribozomale	
	subunit. mică		subunit. mare		particula ribozomală		subunit. mică		subunit. mare		subunit. mică	subunit. mare
	CS	GM	CS	GM	CS	GM	CS	GM	CS	GM	GM	GM
Procariote	30	$0{,}9 \cdot 10^6$	50	$1{,}8 \cdot 10^6$	70	$2{,}7 \cdot 10^6$	16	$0{,}6 \cdot 10^6$	23 5	$1{,}1 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^4$
Eucariote	40	$1{,}3 \cdot 10^6$	60	$2{,}7 \cdot 10^6$	80	$4 \cdot 10^6$	18	$0{,}7 \cdot 10^6$	28 5 7	$1{,}8 \cdot 10^6$	$12-25 \cdot 10^3$	$12-25 \cdot 10^3$

Scanned with OKEN Scanner

ale compoziției în baze azotate, constatîndu-se un procent mai mare de purine față de acela al pirimidinelor. La *E.coli* în ARN 16 S a fost estimat un număr de 1680 ± 70 nucleotide, printre care apar și nucleotide metilate și pseudouridină. La extremitatea 5′ se află secvența p AAAUUG iar la cea 3′ se află secvența AAAUAUAUACACCCCUA OH^-.

La ARN 23S nu se remarcă similitudine de baze cu ARN 16S. El are la extremitatea 3′—OH secvența $GCUUAACCUU_{OH}$. Cuprinde numeroase baze metilate și secvențe repetate.

La drojdie apar diferențe notabile între secvența ARNr 18S și 28S apreciate prin metoda *fingerprint*. Dar sînt insuficiente datele de secvențiere pentru o caracterizare corespunzătoare a structurii primare a ARNr la eucariote. Studii hidrodinamice și spectrofotometrice au evidențiat prezența de regiuni scurte dublu-catenare formate prin împerecheri de tip A—U sau G—C, existînd o concentrare de purine în regiunile monocatenare (Ebel, 1972). ARNr are o structură secundară *in vivo* asemănătoare cu aceea a ARN liber în soluție (Spirin și Gavrilova, 1969). ARNr reprezintă scheletul structural al ribozomilor, proteinele ribozomale atașîndu-se în situri specifice, imprimînd ribozomului o structură ordonată bazată pe interacțiuni ribonucleoproteinice care determină o asemenea configurație spațială, încît conferă particulei ribozomale rezistență la acțiunea enzimelor hidrolitice. Există interdependențe specifice între moleculele ARN 16S și 23S și proteinele ribozomale corespunzătoare, căci subunitățile ribozomale 30S și 50S sînt mai ușor atacate de asemenea enzime hidrolitice comparativ cu particula ribozomală unitară 70S.

d) *Prelucrările posttranscripționale ale moleculelor ARNr*. La eucariote prelucrarea posttranscripțională a acestor molecule presupune excizia unor secvențe din produsul primar de transcriere și modificarea chimică a unora din bazele rămase. Cantonate în regiunea NO la eucariote (Ritossa și Spiegelman, 1965), genele ribozomale sînt transcrise ca un precursor comun (transcriere poligenică) numit pre-ARNr sau pro-ARNr ce conține gene ale ARNr 7S, 18S și 28S și unele secvențe spațiatoare (ADN spațiator).

Molecula de pre-ARNr are o greutate moleculară de 2,3—2,9 × $\times 10^6$ daltoni la plante, și $2{,}6 \times 10^6$ daltoni la *Xenopus* și $4{,}1 \times 10^6$ daltoni la mamifere, constanța de sedimentare variind între 35S și 45—47S (fig. 34). În timpul transcrierii poate avea loc o metilare primară a unor baze din secvențele corespunzătoare la 18S și 28S, dar asemenea modificări chimice sînt caracteristice prelucrărilor posttranscripționale. Moleculele 28S și 18S în timpul complexării cu proteinele ribozomale specifice suferă înfășurări cu formare de regiuni dublu-catenare.

Scanned with OKEN Scanner

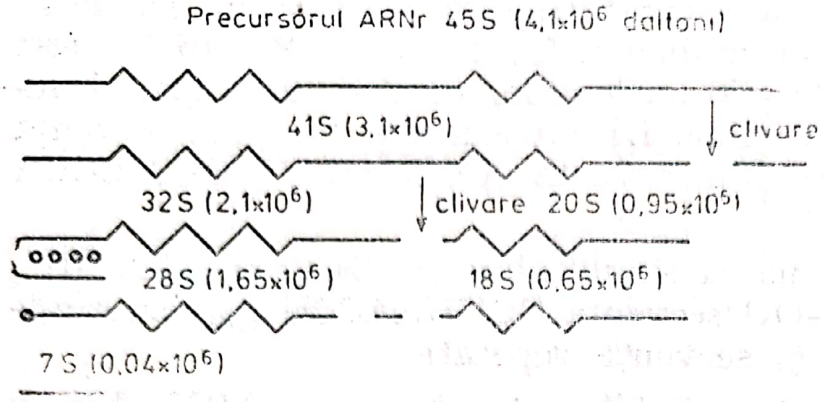


Fig. 34. **Prelucrările posttranscripționale ale pre-ARNr în celulele HeLa** (după Weinberg și Penman, 1970).

Particulele preribozomale cu constanța de sedimentare 80S sînt eliberate ca ribozomii maturi în citoplasmă, la nivelul lor avînd loc înlocuirea unor proteine cu altele, specifice ribozomilor maturi.

În urma prelucrărilor posttranscripționale (Weinberg și Penman, 1970) în nucleol se formează molecule 16—19S și 32S prin excizia de regulă a unor părți nemetilate. La pre-ARNr 45S conținutul G + C este de 70—71%, pe cînd la ARN 28S acesta este de 67% iar la ARN 18S, 56—58%. Scăderea conținutului G + C în cursul prelucrării posttranscripționale este însoțită de metilarea unor baze rămase în secvență (9 la 1000 nucleotide în ARNr 28S și 15 la ARNr 18S), cel mai frecvent sub formă de 2′—0-metil-riboză, prin activitatea unor metiltransferaze specifice, ca donator servind S-adenozinmetionina.

Din clivarea ARN 32S se formează ARNr 28—30S. În procesul prelucrărilor posttranscripționale intervin și enzime convertaze, un tip particular de exo-endonucleaze (Binding, 1977) ce au probabil capacitatea de a recunoaște segmente specifice dublu-elicoidale din molecula precursoare formate prin împerecheri de baze și pe care le excizează ducînd la reducerea pînă la jumătate a precursorului.

La procariote nu se înregistrează o prelucrare posttranscripțională propriu-zisă, precursorii ARNr 16S și 23S fiind sintetizați sub forma unui transcript unic care este în același timp clivat în moleculele mature ARNr 16S și 23S, ceea ce înseamnă că separarea în moleculele ARNr 16S și ARNr 23S, se realizează chiar în timpul transcrierii. Pre-ARNr 16S are 100 nucleotide suplimentare față de molecula matură și nu suferă metilare, decît după ce se asociază cu proteinele spre a forma subunitatea precursoare ribozomală. Numai transcriptul inițial 5S nu suferă modificări posttranscripționale.

e) *Organizarea genelor ribozomale.* Secvențele de nucleotide din ADN care servesc drept matriță pentru sinteza ARNr alcătuiesc genele ribozomale sau genele ARNr (Birnstiel și colab., 1971) a căror totalitate formează ADN ribozomal (ADNr). Experiențele de hibridare moleculară ARNr-ADNr au permis localizarea extranucleolară a genelor pentru ARN 5S pe cromozomul 2 la drosofilă, pe cînd genele 18S și 28S se află la nivelul regiunilor organizator-nucleolare (NO)

Scanned with OKEN Scanner

localizate pe cromozomii de sex. Densitatea de plutire a ADNr pentru 5S este mai ușoară față de ADNr 18S și 28S, ceea ce sugerează diferențe în compoziția în baze a secvențelor din ADN corespunzătoare celor trei tipuri de ARNr.

Gradul de diversificare evolutivă a ARNr este foarte limitat, de vreme ce ARNr de la echinoderme hibridează *in situ* cu ADNr din celulele umane HeLa.

Mutanții „O-nu" de *Xenopus* prezintă gene normale pentru ARN 5S, dar sînt lipsiți de gene pentru ARN 18S și 28S, ceea ce este un indiciu că cele trei tipuri de gene nu sînt lincate. Transcrierea acestor trei tipuri de gene ribozomale este însă coordonată, genele 5S de la mutanții „O-nu", deși prezente, nu sînt transcrise în absența genelor ribozomale 18S și 28S (Brown și Gurdon, 1964). Experiențele de hibridare au permis evidențierea de copii multiple ale genelor ribozomale și la procariote precum *E. coli* și *B. subtilis* (Doolittle și Pace, 1971; Spadari și Ritossa, 1970), fiind 3—10 asemenea copii pe cromozom pentru toate cele trei tipuri de ARNr dispuse într-un aranjament dispers, nu în tandem. Pluralitatea genelor ribozomale la bacterii ar fi o excepție de la regula absenței secvențelor repetate de nucleotide caracteristică procariotelor.

La *E. coli*, ARNr reprezintă 0,4% din genom. Din totalul de ARN celular circa 80% reprezintă ARNr. Protejat de proteinele ribozomale față de atacul ribonucleazelor, durata de viață a ARNr este mai mare decît a ARNt, el putîndu-se acumula de la un ciclu celular la altul. Totodată transcrierea genelor ribozomale este foarte activă, circa 30 de molecule de ARN-polimerază lucrînd simultan în tandem, pe aceeași genă ARNr, ceea ce a putut fi evidențiat și pe electronografii care au surprins transcrierea genelor ribozomale nucleare. Pe asemenea electronografii la *Xenopus* (foto VIII) apare un gradient de lungime al moleculelor de ARNr orientat din punctul de inițiere spre punctul terminus, zonele matriței active în transcriere fiind separate de zone inactive. La bacterii pe fiecare genă pentru ARNr 16S se sintetizează circa 60 molecule de ARN 16S pe minut corespunzînd la 20 000 molecule ARNr 16S prezente într-o celulă de *E. coli* aflată în cultură cu creștere rapidă.

La eucariote, genele pentru ARNr sînt reprezentate prin copii multiple (tabelul 6) ce alcătuiesc grupe sau baterii de gene dispuse în ADNr localizat la nivelul regiunii NO a cromozomilor organizatori nucleolari. ADNr este asociat nucleolului. Chiar genele pentru ARN 5S sînt prezentate în 24 000 copii per genom haploid la *Xenopus*, dispuse în tandem în grupe de 18 la capetele telomerelor cromozomilor. În ovocitele de *Xenopus* au fost evidențiate și pseudogene 5S care, spre deosebire de genele normale, au cu 19 nucleotide mai puțin. Dar se admite că aceste pseudogene fie că nu sînt transcrise, fie că produșii lor de transcriere nu sînt funcționali, avînd o durată scurtă

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 6

Redundanța genelor ARNr în diferite sisteme biologice (după John și Lewis, 1975)

Organismul	Procentul de genom omolog față de ARNr	Daltoni per nucleu		Numărul de gene ARNr per genom
		ADN total	ADNr	
E.coli	0,30	$4,0 \times 10^9$	$1,2 \times 10^7$	6
Gallus domesticus	0,30	$1,4 \times 10^{12}$	$3,6 \times 10^9$	200
Drosophila melanogaster	0,27	$2,4 \times 10^{11}$	$6,4 \times 10^8$	260
Celule umane HeLa	0,008	$1,2 \times 10^{13}$	$9,6 \times 10^8$	440
Xenopus laevis	0,1	$3,6 \times 10^{12}$	$3,6 \times 10^9$	1600

de viață (Ford, 1978). Nu este deocamdată cunoscut rostul pseudogenei ARN 5S.

Funcția organizator-nucleolară este esențială pentru viața celulei. La mutanții „O-nu" de *Xenopus laevis* regiunea NO a suferit o deleție. Această deleție, în stare homozigotă, este incompatibilă cu viața, embrionii O-nu în această stare homozigotă neavînd nucleoli în nucleul celulelor lor. Din această cauză embrionii O-nu au o existență foarte limitată, care se bazează de fapt pe funcționarea ribozomilor moșteniți de la genitorul matern heterozigot. Embrionii O-nu sînt incapabili de a sintetiza ARNr 18S și 28S, dar ei pot sintetiza ARNt (ARN 4S) și ARNr 5S. Acest fapt dovedește încă o dată că genele pentru ARNt și ARN 5S nu au localizare nucleolară. La *Drosophila melanogaster*, prin hibridare moleculară, s-a demonstrat că ADNr reprezintă 0,3% din genom, la nivelul regiunii NO aflîndu-se aproximativ cîte 130 copii ale genelor ARNr 18S și 28S. Conținutul în G + C al ADNr pentru ARNr 18S și 28S diferă de acela al ADN pentru ARN 5S, aceste tipuri de ADN separîndu-se prin ultracentrifugare izopicnică. La *X. laevis*, ADNr reprezintă circa 0,2% din genom, fiecare tip de genă ribozomală fiind reprezentată de circa 400 copii. Și genele ARN 5S se află sub formă de copii multiple (pînă la 1000). Experiențele de hibridare *in situ* au permis localizarea genelor pentru ARN 5S la capătul brațului lung al celor mai mulți cromozomi din complementul cromozomal de *X. laevis* (Pardue și colab., 1973) iar la porumb la capătul brațului lung al cromozomului nr. 2.

Proporția de ADNr din genomul eucariot (0,2—0,4%) este apropiată de cea din genomul procariot (0,4%), deși genomul eucariotic este de dimensiuni mult mai mari decît cel procariotic.

La *Drosophila* există un mutant „*bobbed*" care prezintă ca și mutantul O-nu de *Xenopus* deleții în regiunea NO și se manifestă printr-o rată redusă de sinteză a ARNr corelată cu o reducere a ratei de creștere.

Scanned with OKEN Scanner

Circa 1/2 din ADN regiunii NO nu prezintă complementaritate pentru ARNr, fiind deci ADN spațiator, neinformațional, care nu este transcris. Acest fapt a fost evidențiat și electronomicroscopic de către Miller și colab. (1970), și Hamkalo și colab. (1974). ADN netranscris s-a numit și ADN silențios.

În vederea vizualizării transcrierii s-au izolat axe fibrilare nucleolare, reprezentînd ADNr din nucleolii extracromozomali din ovocitele de *Xenopus*. Această fibră axială este circulară, dar prin tratament cu DN-ază se obțin molecule liniare de ADNr de 30 Å diametru. Asociate segmentelor din axa fibrilară de ADNr, separate de segmente spațiatoare, se află circa 100 de fibrile fine de lungime variabilă legate printr-un capăt al lor la axa ADNr (foto VIII). Aceste fibrile fine sînt dizolvate prin tratament cu ribonuclează, tripsină și pepsină, ceea ce înseamnă că sînt de natură ribonucleoproteinică. La punctele de atașare a lor la axa ADNr se află granule de 125 Å diametru ce reprezintă ARN-polimeraza. Fiecare segment al ADNr ce funcționează ca matriță reprezintă, după Miller, un singur locus genic pentru ARNr, estimîndu-se pînă la 1000 asemenea unități, fiind aici vorba de o amplificare selectivă a genelor ribozomale. Pe această cale crește capacitatea sintetică a ovocitei fără a fi prejudiciată desfășurarea normală a complicatelor evenimente din meioză. Imaginile transcrierii genice înregistrate electronomicroscopic la bacterii evidențiază clar existența unei catene sens active și a unei catene inactive în transcriere (vezi foto VII). Imagini întru totul similare celor de la *Xenopus* au fost obținute la alga verde *Acetabularia*, privind transcrierea genelor ribozomale.

3. *ARN mesager (ARNm)*. ARNm este nemijlocit implicat în copierea informației genetice a diferitelor gene, din care cauză compoziția în baze, constanta de sedimentare și greutatea moleculară a diferitelor molecule de ARNm sînt foarte eterogene. ARNm este fracțiunea de ARN cea mai eterogenă, depinzînd de mesajul genetic pe care îl copiază de pe matrița ADN. Dacă ARNt și ARNr nu sînt purtători de informație genetică, ARNm transcrie secvențe ADN foarte variabile care dețin informația genetică ce dictează secvențele de aminoacizi din diferitele catene polipeptidice. ARNm fiind deci complementar (Marmur și colab., 1963) catenei ADN, transcrise ca și celelalte tipuri de ARN dealtfel, este în același timp spre deosebire de acestea și purtător de mesaj genetic, de informație genetică. Acest tip de ARN a fost descris pentru prima dată de către Hershey și colab. (1953) în celulele de *E. coli* infectate cu fagul T_2 și caracterizat de Volkin și Astrachan (1956), ca reprezentînd o macromoleculă complementară ADN-ului fagic. Jacob și Monod (1961) au postulat atașarea ribozomilor la ARNm, acesta fiind un transportor al informației genetice de la ADN fagic la ribozomii gazdei, unde se sintetizează proteinele fagice. ARNm poate fi mai ușor evidențiat în celulele care, după o creștere rapidă, sînt supuse carențelor

Scanned with OKEN Scanner

nutritive (mediu sărăcit). Celulele au în aceste condiții mai mulți ribozomi decît îi pot folosi. Ca atare, sinteza de ARNr este oprită. Se sintetizează însă ARNm, chiar în aceste condiții, avînd încă loc o oarecare sinteză proteinică. ARNm se separă pe coloane ce au pe ele ADN matriță, sau prin ultracentrifugare izopicnică. Cantitatea de ARNm în celulă este foarte mică, reprezentînd 1—2% din totalul ARN. Greutatea moleculară variază în limite mari (media $0,5 \times 10^6$ daltoni), ca dealtfel și constanta de sedimentare (8—45 S) în funcție de lungimea secvențelor de nucleotide ale genelor codificatoare ale diferitelor catene polipeptidice. Fiecare celulă conține o populație eterogenă de molecule de ARNm. Durata de viață a ARNm este mică (Gros și colab., 1961 ; Brenner și colab., 1961). La *B. subtilis* molecula de ARNm poate fi folosită în 10—20 de runde de sinteză a unei aceleiași proteine, timp de circa 2 minute, după care este hidrolizată. Numai la *B. cereus*, cînd celulele sînt induse să devină spori de lungă durată, ARNm este mai stabil, avînd o durată de viață de 6 ore. Durata medie de viață a ARNm la mamifere este mai lungă (3—12 ore). Cea mai lungă durată de viață, de ordinul zilelor, se remarcă în celulele diferențiate de tipul reticulocitelor, în speță în eritocitele enucleate de mamifer (Gurdon și colab., 1973) unde ARNm este sintetizat pe matriță ADN încă din timpul stadiului nucleat. Dar în acest caz există o populație mai uniformă de ARNm, reprezentînd mesagerul pentru globină căci în reticulocitele mamiferelor 90% din sinteza proteinică este reprezentată de sinteza hemoglobinei. În cazuri extreme (starea latentă a ouălelor animalelor și a semințelor de plante) ARNm este păstrat într-o formă stabilă timp de cîteva luni sau chiar ani. În citoplasma neuronilor simpatici a fost evidențiată o structură asemănătoare nucleoidului nedelimitată de o membrană și care conține o rețea de fibrile electronodense. Această structură a fost numită nematozom (Grillo, 1970) și se consideră a conține un ARNm de lungă durată. Acest fapt ar putea fi legat de engramare. Durata scurtă de viață a ARNm este pusă pe seama rolului său de purtător de mesaj genetic. Cu cît acest mesaj este mai repede transmis, cu atît șansele ca el să fie modificat sînt mai mici. ARNm fiind o copie fidelă a matriței ADN pe diferitele segmente ale sale (corespunzătoare diferitelor gene) formează hibrizi moleculari stabili cu o mare parte din ADN total al celulei, pe cînd ARNr formează hibrizi moleculari doar cu o mică fracțiune din ADN total (0,2—0,4%).

La *E. coli* rata de sinteză a ARNm este de 55 nucleotide/s la 37 °C. Sinteza ARNm are polaritatea 5′ → 3′. Genele unui operon ce se află în contiguitate și sînt implicate în dirijarea unor enzime ce intervin în aceeași cale metabolică sînt transcrise în bloc într-o moleculă poligenică de ARNm (care deține mesajul genetic al mai multor gene — (ARNm policistronic).

La scurt timp după inițierea sintezei ARNm, la capătul 5′ al mo-

Scanned with OKEN Scanner

leculei sale, se atașează ribozomii care se mișcă pe molecula ARNm în spatele ARN-polimerazei, în imediata sa apropiere. ARNm este cel dintîi sintetizat (dar și rapid disociat). ARNt și ARNr se sintetizează ulterior. Degradarea ARNm are loc sub acțiunea a cel puțin 5 activități enzimatice de tip RN-ază la *E. coli*, dintre care unele degradează selectiv ARNm.

Degradarea ARNm apare ca un aspect colateral al reglării genetice prin care sînt eliminate din circuitul informațional moleculele de ARNm care nu mai poartă mesajul corespunzător unui moment dat din viața celulei, fiind sintetizate alte molecule de ARNm, corespunzătoare acelui moment. Inactivarea ARNm poate fi nu numai chimică-enzimatică, ci și funcțională cînd acesta pierde capacitatea de a funcționa ca matriță în sinteza proteinică. Degradarea ARNm este intim cuplată cu traducerea mesajului genetic în cadrul biosintezei proteinice, fiind degradată mai întîi de către exonucleaze de tip 5′ → 3′ regiunea proximală operatorului și apoi regiunea sa distală.

Genele transcrise în ARNm sînt prezente în copii unice în genom, fiind gene structurale reprezentate de segmente de ADN cu secvențe unice, nerepetate.

ARNm eucariotic conține regiuni de acid poliadenilic (poli-A) lungi de 50—200 nucleotide ce sînt adăugate la capătul 3′—OH al transcriptului primar de către enzima terminal-riboadenilat-transferaza ce folosește ATP ca donor, Mn^{2+} și un rest de acid adenilic aflat la capătul 3′—OH al moleculei ce servește ca primer pentru sinteza poliadenilatului. Molecula precursoare de ARNm (pre-ARNm) conține secvențe oligo (A) de 5—30 resturi adenilice, regiuni poli-A de 100—200 resturi adenilice și secvențe oligo (U) de circa 30 resturi uridilice. În precursorul ARNm se află de asemenea secvențe de nucleotide care nu poartă mesaj genetic pentru plasarea aminoacizilor în catena polipeptidică și care pe baza complementarității dau structuri secundare de tip *hairpin* (Proudfoot și Brownlee, 1974), reprezentînd regiuni dublu-catenare. Astfel, ARNm pentru catena ușoară (L) a imunoglobulinei are 1250 de nucleotide față de 642 cît ar corespunde secvenței de aminoacizi potrivit reacției de codificare genetică 3 : 1. Aceste secvențe specifice și regiuni dublu-catenare ar putea reprezenta semnale în secvența program a pre-ARNm, situri de atașare pentru proteine stabilizatoare sau situri de excizie enzimatică în cadrul prelucrării posttranscripționale, ca și semnale de reglare transcriptoare și posttranscriptoare, pentru transferul ARNm în citoplasmă și traducerea sa. Prelucrările posttranscripționale reduc dimensiunea pre-ARNm de la 10^7 daltoni la 10^5—10^6 daltoni cît are ARNm matur. ARNm este transcris în cadrul unei unități de transcriere numită transcripton, caracterizat de prezența unui singur promotor autonom de la care este inițiată transcrierea unui grup de gene structurale împreună cu elementele de control. Segmentele transcrip-

Scanned with OKEN Scanner

tonului nu trebuie să fie exprimate coordonat și chiar pot fi separate fizic. De regulă ARNm eucariotic este monocistronic.

După adăugarea poliadenilatului are loc prelucrarea posttranscripțională propriu-zisă a transcriptului ARNm care presupune eliminarea de nucleotide de la extremitatea 5′-fosfat, definitivîndu-se molecula matură de ARNm care trece în citoplasmă (Darnell și colab., 1971). Între secvența ce va fi păstrată în ARNm matur și secvența care va fi excizată în timpul prelucrării posttranscripționale se află secvențe care derivă din transcrierea unor segmente de ADN înalt repetitiv ce pot forma bucle intramoleculare de tip *hairpin*. Acestea, ca și oligonucleotidele bogate în uridilat, pot servi ca semnale pentru modificări posttranscripționale ale moleculelor precursoare de ARNm. La eucariote deci, în prelucrarea posttranscripțională a pre-ARNm, sînt implicate și palindroamele (Georgiev, 1978). Se admite că funcția segmentului poli-A este de a condiționa trecerea în citoplasmă și durata de viață a ARNm (Darnell și colab., 1971), acest segment reducîndu-se pe măsura uzării metabolice a ARNm. De asemenea, acest segment ar fi legat de atașarea ARNm la proteină sau direct la membranele plasmatice (Binding, 1977), facilitînd traducerea mesajului genetic.

La eucariote pot exista molecule de ARNm pentru proteine nehistone care conțin sau nu poli-A, ceea ce s-ar explica prin existența unui mod diferit de transcriere a genelor acestor proteine sau a unui mod diferit de prelucrare posttranscripțională a transcriptelor lor primare.

La eucariote, spre deosebire de *E. coli* (Imamato și colab., 1965) ARNm nu poartă mesaj poligenic. La extremitatea lor 5′, moleculele ARNm de la eucariote poartă o secvență repetată. Transferul moleculelor de ARNm în citoplasmă, după ce au fost prelucrate posttranscripțional, se face în starea lor de molecule nucleoproteinice numite informofere sau informozomi. Ele reprezintă ARNm asociat cu proteine, putînd exista ca particule libere în citoplasmă, neasociate încă cu ribozomii. Termenul de informozom a fost propus de Spirin și colab. (1964) spre a defini particule ribonucleoproteinice cu constanța de sedimentare 20—110 S din citoplasma eucariotelor, particule care conțin ARNm.

Samarina și colab. (1967) au propus termenul de informoferă sau informaton spre a defini un produs de asociere a pre-ARNm cu proteine globulare specifice numite informatine. Pre-ARNm se află situat pe suprafața informoferelor de care rămîne legat în timpul prelucrărilor posttranscripționale de către exo- și endonucleaze. Funcția informoferelor este legată de eliberarea pre- ARNm născînd din cromatină și de stabilizarea moleculei de pre- ARNm în timpul prelucrării posttranscripționale. Asocierea ARNm cu proteine are ca semnificație protecția sa față de atacul altor ribonucleaze, diferite de cele care intervin în prelucrările posttranscripționale.

Scanned with OKEN Scanner

Moleculele de ARNm pentru anumite proteine, necesare în timpul dezvoltării timpurii la animale sînt păstrate în citoplasma ovulului în timpul ovogenezei și nu sînt traduse decît după fecundare. Acesta s-a numit ARNm „matern" sau ARNm „mascat" avînd, se pare, rol important în procesele de determinare din citodiferențiere.

Transcrierea ARNm pe matriță ADN a fost vizualizată electronomicroscopic la *E. coli* de către Miller și colab. (1970). La această bacterie, ca dealtfel la procariote în general, transcrierea și traducerea sînt evenimente simultane, capătul 5′ al catenei ARNm fiind asociat cu ribozomul și tradus în proteină, pe cînd capătul 3′ este încă în procesul de sinteză. Pe această cale ARNm poate fi ușor deosebit de alte tipuri de ARN prin aceea că are atașați ribozomi.

ARNm pentru anumite proteine poate fi extras din celule specializate pentru sinteza acestor proteine. Astfel, din reticulocite de mamifere se poate extrage ARNm pentru globină care are constanța de sedimentare 9S. Cu ajutorul enzimei inverstranscriptază se sintetizează un ADN complementar (ADNc) acestui ARNm pentru globină și acest ADNc reprezintă gena pentru globină. S-a izolat de asemenea ARNm pentru histone, anticorpi, miozină, fibroină etc. Izolarea ARNm mai este facilitată de prezența segmentului poli-A, fiind ușor absorbit pe poli-U-sefaroză sau oligo (dT) celuloză.

ARNm de la eucariote, ca și ARN viral ce funcționează în calitate de ARNm, cuprinde în secvența sa porțiuni netraduse, fapt remarcat la ARNm pentru globină (Scherrer, 1973). După cum în ADN se află secvențe care nu sînt transcrise, tot astfel în ARNm se află secvențe care nu sînt traduse. Rolul unor astfel de secvențe nu este încă bine cunoscut.

7. **ARN nuclear eterogen (ARNhn sau ARNhet).** Acest tip de ARN este întîlnit doar la eucariote, fiind reprezentate de molecule eterogene ca dimensiune (GM $= 5 \times 10^5 - 2 \times 10^7$ daltoni) și constanta de sedimentare (6S—30S).

ARNhet. Originea și localizarea sa sînt extranucleolare (Weinberg, 1973) iar durata de viață este 5—30 minute. ARNhet prezintă proprietăți comune cu ale ARNm, conținutul G + C fiind în ambele cazuri similar cu cel din ADN genomic. Ca și ARNm eucariotic, conține regiuni de acid poliadenilic (poli-A), lungi de 50—200 nucleotide, adăugate posttranscripțional la capătul 3′—OH al transcriptului primar prin activitatea enzimei terminal riboadenilat-transferaza. Deoarece poliadenilatul se leagă covalent de transcriptul primar, se admite că acesta conține un rest adenilic care funcționează ca primer în sinteza poli-A. Dar poli-A nu este sintetizat printr-un mecanism de transcriere, deoarece nu au putut fi decelate în matrița ADN segmente lungi poli-dT.

Scanned with OKEN Scanner

Există părerea după care ARNhet este de fapt precursorul ARNm. Dar, spre deosebire de ARNm, o fracțiune mare din ARNhet nu părăsește niciodată nucleul iar participarea sa în sinteza proteinică este improbabilă.

Durata de viață a ARNhet este în general mai mică decît a ARNm. Molecula de ARNhet conține și secvențe repetate. În virtutea ipotezei că ARNhet este un precursor ARNm, înseamnă că precursorul ARNm conține pe lîngă secvențele specifice ale ARNm și lungi secvențe lipsite de mesaj genetic, căci moleculele ARNm trecute în citoplasmă prezintă o mult mai limitată variație a greutății moleculare (pînă la $1,5-10^7$ daltoni). Pe baza existenței de lungi secvențe poli-A atît în ARNm, cît și în ARNhet se admite că cele două tipuri moleculare reprezintă una și aceeași macromoleculă din care secvența purtătoare de mesaj genetic împreună cu segmentul poli-A sînt trecute în citoplasmă iar restul moleculei rămîne în nucleu ca ARNhet. Ca și ARNm, nu toate moleculele de ARNhet conțin secvențe poli-A. Dacă în ARNhet se află pînă la 25% secvențe repetate, în ARNm nu apar decît pînă la 10% secvențe repetate. Pe lîngă segmentul poli-A rezistent la acțiunea RN-azei, ARNhet mai cuprinde și alte regiuni rezistente la acțiunea acestei enzime dat fiind faptul că au o structură dublu-catenară. Asemenea regiuni dublu-catenare nu se întîlnesc în ARNm citoplasmatic (Weinberg, 1973). Regiunile dublu-catenare ale ARNhet prezintă configurații *hairpin* care sînt excizate în timpul prelucrărilor posttranscripționale, ca dealtfel și capătul 5′ unde se află un tetrafosfat. ARNhet mai conține un segment homopolimeric, și anume poli-U care, fiind aflat în interiorul moleculei, este transcris de pe matrița ADN. Acest poli-U însă nu mai apare în ARNm matur (citoplasmatic), fiind excizat în cadrul acelorași prelucrări posttranscripționale. La unele eucariote inferioare (unicelulare) nu apare ARNhet, ARN nuclear fiind în limitele de dimensiune ale ARNm (Edström și Lambert, 1976).

În metafaza mitozei este absentă sinteza ARNhet ca și a ARNr. În această fază se sintetizează însă ARN 4S (ARNt) și ARN 5S în proporție de 35%, respectiv 75%, din rata de sinteză interfazică a acestora.

Weinberg (1973) a descris la eucariote și un ARN nuclear stabil metabolic (trece de la o generație celulară la alta) de greutate moleculară mică pe care l-a simbolizat ARNsn. El sedimentează la 6—8 S și se află în fracțiunea extranucleolară. Este supus unor intense metilări posttranscripționale. Unele dintre cele 5 fracțiuni majore ale ARNsn conțin pseudouridină. Spre deosebire de ARNt, ARNsn are o slabă capacitate de a accepta aminoacizi. Studii de secvențiere a ARNsn au stabilit o concentrare a pirimidinelor la capătul 3′ și a purinelor la capătul 5′. ARNsn de la om este foarte asemănător dacă nu identic, după *fingerprint*, cu cel de la șoarece, dar ARNsn de la

Scanned with OKEN Scanner

Tetrahymena este diferit față de cel de la metazoare. Asociat cu proteine, ARNsn formează particule ribonucleoproteinice în nucleoplasmă care sedimentează la 20—180 S. Anumite fracțiuni ale ARNsn se leagă tranzitoriu prin punți de hidrogen cu ARNr 28S după clivarea acestuia din precursorul 32S, sugerîndu-se participarea sa în etapa finală a prelucrării posttranscripționale a ARNr 28S, ca și a altor tipuri de ARN. Dar funcția ARNsn rămîne în esență neclarificată.

8. **ARN cromozomal (ARNc).** A fost descris în 1965 de către Huang și Bonner, fiind izolat din cromatină dizolvată în CsCl 4M și ultracentrifugată izopicnic. În partea superioară a soluției se colectează o peliculă formată din proteine și ARN. Proteinele sînt digerate cu pronază, rămînînd ARN cromozomal. Moleculele ARNc sînt foarte mici (30—40 pînă la 200 nucleotide), fiind covalent asociate cu histonele. Ele conțin 8—27% acid dihidrouridilic și 7—10%. resturi timină. ARNc este singurul ARN celular care în unele cazuri are o greutate moleculară mai mică decît a ARNt. Nu este exclus ca el să reprezinte un produs de degradare a ARNhet, ARNt sau ARNr.

ARN cromozomal legat la ADN din structura cromatinei de ficat de șoarece constă din segmente mijlocii repetate ale transcriptelor inițiale care în cadrul prelucrărilor posttranscripționale sînt excizate, rămînînd ca molecule ARNc în nucleu (Holmes și colab., 1972), secvențele ARNc hibridîndu-se exclusiv cu secvențele mijlocii repetate ale ADN din întregul genom, corespunzător la 2—5% din ADN total. Se pare că intervine în reglajul activității genice. În unele lucrări (vezi Herschowitz, 1977) se vorbește și despre existența unui ARN bicatenar genetic, care ar servi ca matriță pentru o ARN-polimerază celulară — replicază — dependentă de ARN bicatenar găsită în reticulocite, hepatocite și în nucleul celulelor din embrionii de arici de mare. Încă nu se știe care ar fi rostul unui asemenea ARN genetic celular.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul V

ARN VIRAL ŞI REVERSTRANSCRIEREA

1. **ARN viral şi replicarea sa.** ARN viral este singurul tip de ARN care are funcţie genetică. ARN viral reprezintă miezul de acid nucleic la ribovirusurile vegetale, unele virusuri animale (ex. al poliomielitei) şi la unii bacteriofagi (M_{55}, R_{17}, Qβ etc). El poate fi monocatenar (VMT, virusul stomatitei veziculare, virusul influenza, apoi virusul polio şi bacteriofagii F_2, R_{17}, Qβ etc.) sau dublu-elicoidal, prezentînd catene complementare (reovirus). Ribovirusurile cu ARN monocatenar reprezintă un caz interesant de dualitate biologică, genomul şi transcriptul fiind într-un anume sens unul şi acelaşi lucru, aceeaşi enzimă, numită replicază sau transcriptază, servind atît funcţia de replicare, cît şi funcţia de transcriere.

Majoritatea virusurilor, incluzînd pe cele al căror miez de acid nucleic este ARN dublu-catenar, prezintă ca eveniment iniţial, după pătrunderea în celula gazdă, sinteza unui ARN masager (Temin şi Baltimore, 1972).

În unele cazuri, virionii celulelor animale conţin enzima responsabilă pentru sinteza acidului nucleic care are loc imediat după infecţie. Aceasta este o ARN-polimerază specific virală. Ea se află în virionii virusurilor ARN. Descoperirea unei ARN-polimeraze în virionii virusului stomatitei veziculare l-a impulsionat pe Baltimore să cerceteze ADN-polimeraza direcţionată de ARN (reverstranscriptaza) dintr-un ribovirus oncogen.

La intrarea în celula gazdă, monocatena ARN considerată catena „+", care este şi catenă sens în transcriere, acţionează ca un ARNm, ataşîndu-se la ribozomii celulei gazdă, şi dictează sinteza replicazei specific virale (Spiegelman şi colab., 1967). Aceasta recunoaşte genomul ARN care a dictat sinteza sa (catena „+") şi îl foloseşte ca matriţă pentru sinteza unor catene complementare (catene „−") (fig. 35). Rezultă o formă replicativă dublu-catenară (RF) a ARN viral care rezistă la RN-ază, prezentînd curbe de denaturare şi densitate de plutire caracteristice unei structuri dublu-catenare. În cazul ARN fagic, cum este cel al fagului f_2, replicarea seamănă mai mult cu transcrierea decît cu replicarea ADN, deoarece matriţa şi replicile

Scanned with OKEN Scanner

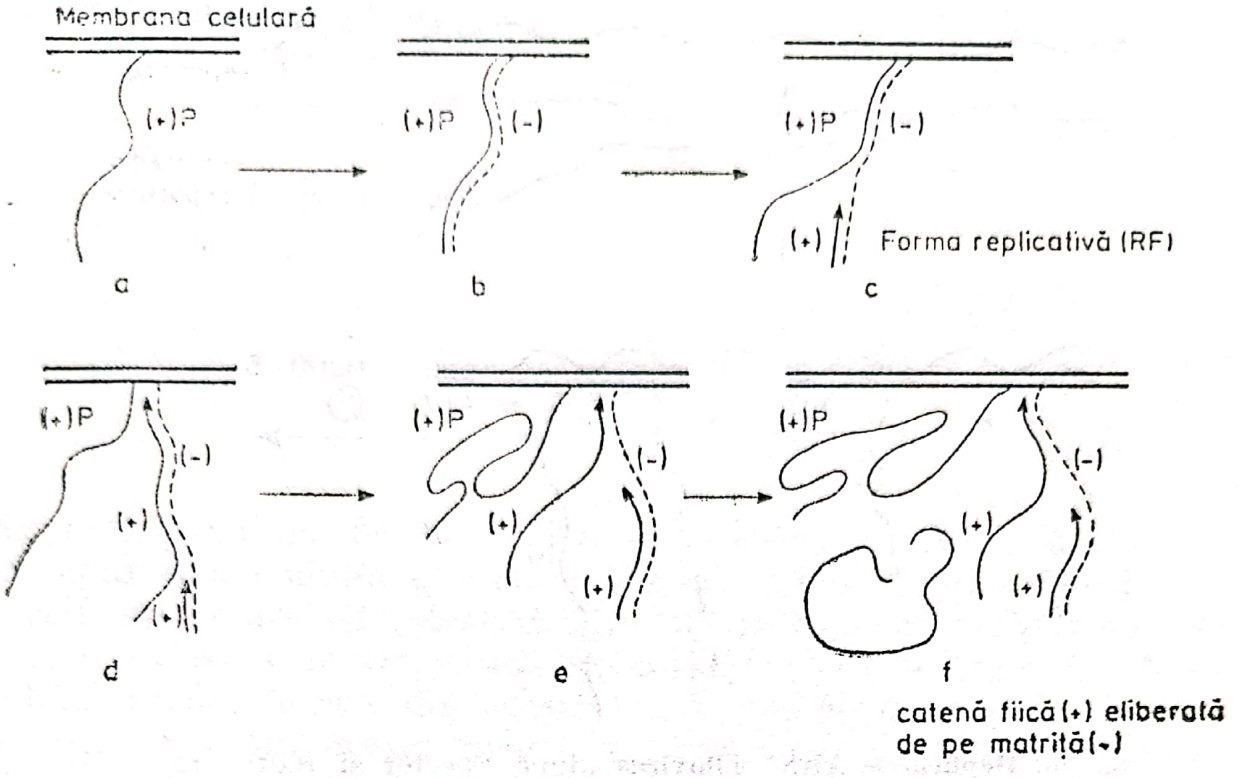


Fig. 35. **Replicarea ARN monocatenar la bacteriofagii ARN:** a — (+) = p — catena parentală ce pătrunde în celula gazdă; b — sinteza unei catene complementare „—"; c, e — folosirea repetată a catenei (—) ca matriță pentru sinteza de noi catene complementare „+" progene (replicarea asimetrică a formei replicative, bicatenare) (după Stanier și colab., 1970).

sînt unite numai la capătul în creștere al replicii. După mai multe runde de replicare în care pe catenele „—" se sintetizează catene „+", unele dintre aceste catene „+" funcționează ca ARNm în a cărui secvență se află trei gene corespunzătoare la trei proteine, fiecare avînd codonul său de inițiere AUG. Aceste proteine sînt replicaza, proteina capsidei și proteina de maturare necesară asamblării constituenților particulei virale.

O parte din catenele „+" vor fi împachetate în capside proteinice în procesul de multiplicare virală. La virusul stomatitei veziculare, în cursul asamblării noilor particule virale, cîte o moleculă de replicază este împachetată împreună cu catena „+" nou sintetizată. Această replicază va fi injectată odată cu catena „+" în celula gazdă în următorul ciclu de infecție. În cazul acestui virus, catena „—" funcționează ca ARNm în sinteza proteinelor specifice. La virusul polio, s-au adus dovezi potrivit cărora, în replicarea ARN polio intervine în calitate de primer (în inițierea replicării) o proteină desemnată VPg. Această proteină este covalent atașată la capătul 5′ terminal al oligonucleotidei VPg—pU—U—A—A—A—A—C—A—Gp la catenele născînde ale intermediarului replicativ (fig. 36) și la poli (U) al catenelor minus (Nomato și colab., 1977; Lee și colab., 1977).

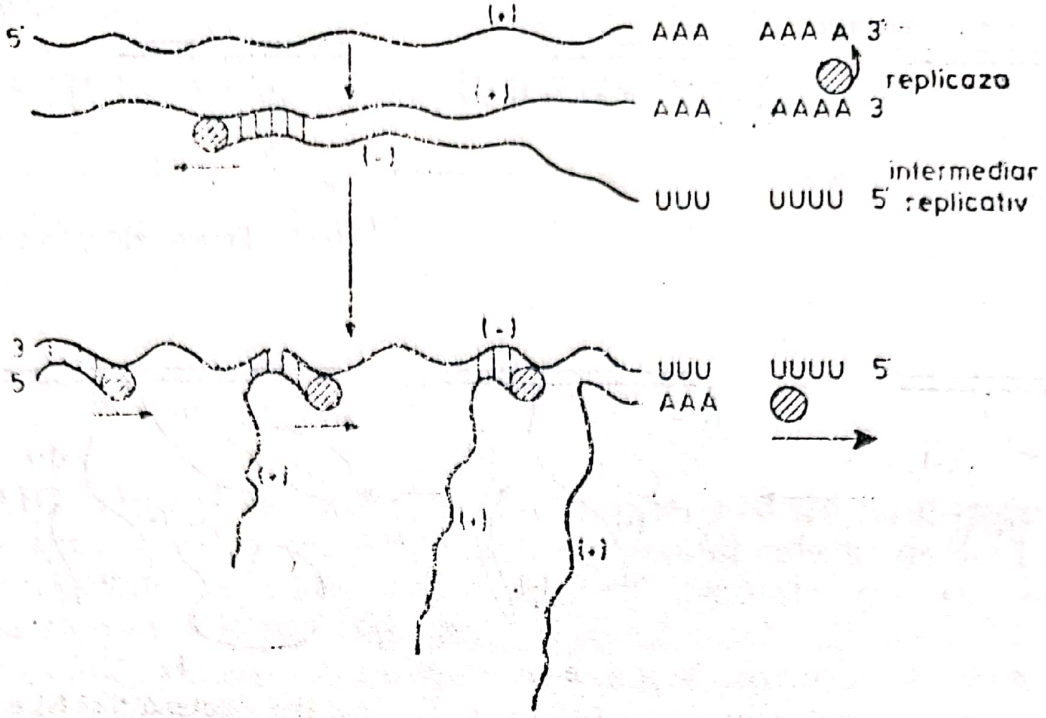
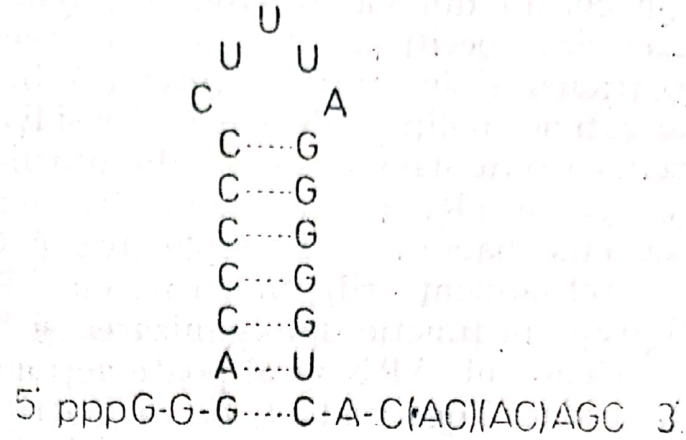


Fig. 36. **Replicarea ARN poliovirus** (după Spector şi Baltimore, 1977).

Recent au fost obţinute progrese importante în studiul structurii ARN la numeroase virusuri. Cel mai bine cunoscută este structura bacteriofagilor Qβ şi R_{17} a căror moleculă ARN are 3300—3500 nucleotide (Ebel, 1972). Multe molecule ARN viral, cum sînt cele de la VMT şi de la fagii F_2, R_{17}, MS_2, Qβ, prezintă la extremitate 3′ aceeaşi secvenţă CCCA—OH. Extremitatea 5′ a celor mai mulţi fagi ARN are pppG. S-a constatat că adenilatul 3′ terminal nu este esenţial pentru caracterul infecţios al acestor ARN. De asemenea, primele 100 nucleotide de la capătul 5′ al moleculei ARN de la R_{17} nu sînt traduse în secvenţa de aminoacizi, ca dealtfel şi primele 50 nucleotide ce preced capătul 3′ al secvenţei sens.

Asemănarea structurală a extremităţii 3′ a ARN viral şi a ARNt implică intervenţia unei enzime asemănătoare sau comparabile cu ARNt—CCA—pirofosforilaza. La fagul Qβ a fost determinată secvenţa a 175 nucleotide pornind de la extremitatea 5′. La această extremitate se află o regiune cu structură dublu-catenară de tip *hairpin* (fig. 37) bazată pe împerecheri intracatenare A—U şi G—C. La acest fag a fost, de asemenea, stabilită secvenţa primelor 150 nucleotide din ARN ce corespund sitului de ataşare la ribozom a genei pentru proteina capsidei. La fagul R_{17} se cunoaşte secvenţa de 120 aminoacizi a proteinei de asamblare (Jeppesen şi colab., 1970). Pe baza tehnicii Sanger, s-a stabilit o porţiune lungă de 57 nucleotide din secvenţa ARN fagic care codifică această proteină, constatîndu-se o remarcabilă corespondenţă între codoni şi aminoacizi, reprezentînd o confirmare directă a codului genetic. S-a descifrat, de asemenea,

Fig. 37. Posibilă structură secundară în ARN Qβ (după Ebel, 1972).



secvența parțială de baze pentru proteina capsidei, dovedindu-se ambiguitatea codului genetic, aminoacizii leucina și izoleucina fiind specificați de același codon (AUU). Tot la R_{17} s-au stabilit secvențele corespunzătoare la trei situri de atașare a ARN fagic la ribozomii celulei gazdă, fiecare din aceste situri conținînd codonii de inițiere AUG. Două din aceste situri, ce corespund la proteina capsidei și proteina de maturare, prezintă o aceeași secvență pentanucleotidică UUUGA în regiunea care precede codonul de inițiere, ea nefiind prezentă la situl de atașare la ribozom al secvenței (genei) corespunzătoare ARN-sintetazei virale. Între codonul terminal al secvenței pentru proteina capsidei la ARN de R_{17} și codonul de inițiere pentru replicază se află o secvență de 21 nucleotide. Molecula ARN R_{17} conține, de asemenea, secvențe netraduse, la ambele extremități și structuri dublu-catenare de tip *hairpin* care se află și în ARN al fagului Qβ (fig. 37). Studiile de secvențiere au arătat prezența la capetele 5′ și 3′ ale moleculei de ARN fagic (catena „+") de secvențe de cîteva sute de nucleotide care nu codifică nici o parte a celor trei proteine — proteina capsidei, replicaza și proteina de maturație — sintetizate în celulă în timpul infecției fagice. Aceste secvențe lungi terminale netraduse pot juca rol în replicarea ARN fagic, în reglarea expresiei genice sau în morfogeneza particulelor fagice.

Structurile *hairpin* permit după unele ipoteze o mai mare stabilitate a ARN, mai ales în timpul perioadei de infecție, oferind moleculei ARN o stare mai compactă spre a fi mai ușor împachetată în capsida proteinică și de asemenea ar putea constitui situri de recunoaștere de către ribozom în timpul sintezei proteinelor virale sau de către proteinele capsidei în timpul asamblării fagului. Folosindu-se o replicază Qβ, foarte bine purificată, s-a reușit sinteza *in vitro* a ARN al acestui fag. Forma replicativă este labilă și se desface rapid în cele două catene complementare „+" și „−". Catenele „+" sintetizate *in vitro* au aceleași proprietăți infecțioase ca și cele sintetizate *in vivo*, prezentînd aceeași rată de mutație, indiciu că atît *in vivo* cît și *in vitro* replicaza copiază cu aceeași exactitate matrița. Replicaza

Scanned with OKEN Scanner

Qβ constă din patru subunități polipeptidice neidentice, dintre care trei sînt specificate de genomul gazdă *E. coli*. Dintre acestea, două participă și în sinteza proteinică bacteriană ca factori de elongație ai catenei polipeptidice EF—Tu și EF—Ts, iar a treia reprezintă proteina ribozomală S—1 a subunității ribozomale 30 S care participă la legarea ARNm la ribozomi. Nu se știe însă ce rol îndeplinesc aceste proteine bacteriene în replicarea ARN fagic.

Actualmente ribovirusurile cu ARN monocatenar sînt grupate în 6 grupe în funcție de organizarea și funcționarea genomului lor ARN.

Genomul ARN viral poate acționa mai întîi, fie ca ARNm (Picornaviridae, Togaviridae), fie ca matriță pentru sinteza de acid nucleic (replicare) (Retroviridae, Arenaviridae, Coronaviridae etc.). Dovada directă că ARN viral-catena „+" îndeplinește rol de ARNm a fost adusă de Zinder și colab., lucrînd cu ARN extras de la fagul f_2, care a determinat într-un amestec de reacție corespunzător *in vitro* sinteza de proteine fagice specifice. Aceasta este prima demonstrație a sintezei *in vitro* a unei proteine naturale (în acest caz proteina capsidei fagice) de către un ARNm natural.

2. **Reverstranscrierea.** 1. *Reverstranscriptaza și reverstranscrierea.* Încă din anul 1963, Cavalieri a arătat că ARN poli (A—U) poate fi folosit ca matriță de către ADN-polimeraza I de *E.coli* pentru sinteza unei catene ADN, poli d (T—A). În anul următor, pe baza studiului transmiterii informației ereditare virale în celulele infectate cu oncovirusuri ARN și experiențelor cu inhibitori ai sintezei ADN și ARN, este avansată ipoteza că virusurile oncogene ARN, spre deosebire de celelalte ribovirusuri, nu se replică printr-o formă replicativă dublu-catenară, ci printr-un intermediar ADN. În anul 1970, este descrisă enzima reverstranscriptaza (Temin și Mizutani, 1970; Mizutani și Temin, 1970; Baltimore, 1970), numită și inverstranscriptaza sau, simplu, revertază, ca intervenind în replicarea virusurilor oncogene ARN, numite leucovirusuri, incluse în grupul Retroviridae.

Replicarea leucovirusurilor, implicînd transferul informației genetice de la ARN la ADN, reprezintă o violare a dogmei centrale a biologiei moleculare. Acest transfer este catalizat de revertază care este o ADN-polimerază dependentă de ARN. Replicarea leucovirusurilor este dependentă de desfășurarea unei sinteze timpurii de ADN, fiind totodată sensibilă la actinomicină D. Reverstranscriptaza folosește ca matriță ARN al leucovirusului iar ca substrat dezoxiribonucleozidele trifosfat obișnuite spre a sintetiza o catenă de ADN, complementară ARN viral. Ulterior, monocatena ADN este convertită într-o structură bicatenară ADN. Denumirea cea mai corectă a acestei enzime ar fi, după Temin și Mizutani (1974), ADN-polimerază direcționată de ARN și ADN.

Scanned with OKEN Scanner

Cunoștințele actuale despre această enzimă sînt limitate. Ea folosește ca matriță homo- sau heteropolimeri ADN și ARN, necesitînd un capăt primer 3′—OH ADN sau ARN pentru sinteza unei catene ADN în direcția 5′→3′ în prezența Mg^{++} sau Mn^{++}. Reverstranscriptaza se deosebește serologic și după afinitățile față de matriță de ADN-polimerazele celulare. Ea reprezintă o ADN-polimerază a virionului care însă prezintă unele caracteristici comune cu ADN-polimerazele celulare, de unde s-a tras concluzia că oncovirusurile ARN ar fi putut deriva din elemente ale celulei normale (Mizutani și colab., 1974).

Spre deosebire de ADN-polimerazele celulare, ADN — polimerazele oncovirusurilor aviare ARN utilizează matrițe ARN homopolimerice în prezența unui primer corespunzător. Preferința ADN-polimerazelor leucovirusurilor ARN față de anumite matrițe — primer ribopolimerice este singura particularitate care le deosebește de alte ADN-polimeraze. Revertazele se caracterizează printr-un înalt grad de fidelitate în copierea ARN viral, ca dealtfel și a heteropolimerilor, această din urmă proprietate fiind folosită în experiențele de sinteză prin reverstranscriere a genelor de la eucariote. În acest caz se poate folosi ARNm pentru hemoglobină, histone, insulină sau hormon somatotrop, izolat din celulele în care are loc o sinteză intensă a acestor produși genici, sintetizîndu-se un ADN complementar (ADNc), care în forma sa bicatenară reprezintă genele corespunzătoare (pentru hemoglobină, ovalbumină, insulină etc.).

Prin reverstranscriere *in vitro* s-a sintetizat un ADN folosind virioni purificați ai virusului leucemiei murine. Acest ADN s-a dovedit a fi infecțios (Rothenberg și colab., 1977). Reverstranscriptaza leucovirusurilor mamiferelor este reprezentată de o singură catenă polipeptidică cu GM = 70 000 — 90 000 daltoni, pe cînd cea aviară (din virusul sarcomului Rous sau din AMV) este reprezentată de două catene polipeptidice de 110 000, respectiv 69 000 daltoni. Funcția subunității mari este polimerazică și ribonuclează H, pe cînd a subunității mici este necunoscută. Revertaza aviară reprezintă 1% din proteina virionului. Această ADN-polimerază virională copiază atît ADN, cît și ARN. ADN bicatenar este folosit ca matriță numai dacă prezintă incizii monocatenare. Matrițele monocatenare, prin pliere înapoi pe ele însele, oferă acestei polimeraze un capăt primer 3′—OH. Se pare că genomul viral posedă informația genetică pentru sinteza reverstranscriptazei, dar nu este exclus să fie folosită o ADN-polimerază celulară transformată în timpul infecției. Și în celulele animale s-au identificat polimeraze ce copiază preferențial poli — rA și s-au numit R-ADN-polimeraze sau poli (dT)-sintetaze. Asemenea polimeraze care pot folosi ca matriță ARN homo sau heteropolimer au fost izolate din celule neinfectate experimental cu oncovirusuri ARN, din fibroblaste normale de șobolan și găină, embrioni de găină, ovule

Scanned with OKEN Scanner

de arici de-mare sau limfocite umane stimulate. Mai mult, ADN-polimeraze dependente de ARN au fost evidențiate și la virusuri neoncogene, în particule asemănătoare virusurilor extrase din lapte de femeie, în celule normale de om și șoarece, în limfocite stimulate cu fitohemaglutinină, ca dealtfel și în celule neoplasmice și leucemice umane în absența oricăror virusuri ARN etc. De asemenea, la *E. coli* s-a identificat o ADN-polimerază care folosește ca matriță ARN, dar cu o eficiență de numai 0,1% din aceea cu care copiază matrița ADN. Este deci vorba de un grup mare de enzime, capabile de a sintetiza ADN pe diferite matrițe ARN.

Chiar ADN-polimerazele obișnuite, dependente de ADN, pot utiliza uneori matrițe ribohomopolimerice cu destulă eficiență, dar capacitatea ADN-polimerazei virionale (revertazei) de a copia cu cea mai mare eficiență ARN virional, precum și alte tipuri de ARN, este remarcabilă și o diferențiază de alte ADN-polimeraze, incluzînd pe cele celulare. ADN-polimerazele celulare ARN dependente se deosebesc de revertazele virionale și prin preferința lor pentru Mn^{2+} și incapacitatea de a folosi ADN natural în calitate de matriță. Nu se cunoaște încă dacă între aceste două categorii de polimeraze există diferențe structurale sau chimice majore. Nu sînt, de asemenea, cunoscute proprietățile reacției endogene de reverstranscriere desfășurată în celulele infectate. Sistemul polimerazic este aparent localizat în miezul virionului, înconjurat de o membrană care derivă prin înmugurirea membranei celulare.

Activitatea ADN-polimerazei virionale este sensibilă la concentrații mari de actinomicină D și insensibilă la rifampicină.

2. *Genomul leucovirusurilor*. Cea mai bună matriță pentru ADN-polimeraza virionului este ARN viral care are constanta de sedimentare 60—70 S extras din virionii leucovirusurilor. Acest ARN este format din fragmente mai mari ce au 35 S și fragmente mai mici de 4—5 S, ce pot fi legate prin punți de hidrogen dînd porțiuni dublu-catenare. La capătul 3′ al subunității 35 S se află circa 200 resturi adenilat, formînd deci un poli-A. Unul dintre aceste fragmente 4 S poate îndeplini funcția de primer în reverstranscriere și poate fi de proveniență celulară, de exemplu o moleculă de ARNt inclusă în virion odată cu asamblarea sa. Moleculele 4 S se termină cu un rest adenilat legat covalent la dezoxiadenilatul catenei ADN nou sintetizate la toate oncovirusurile aviare. Acestea au identice cel puțin primele opt nucleotide în secvența acestei copii ADN cu succesiunea următoare:

$$\underbrace{\text{— pA}}_{\text{primer}} \qquad \underbrace{\text{pApApTpGpApApGpC}}_{\text{ADN nou sintetizat}}$$

3. *Replicarea ARN al virionului oncovirusurilor*. Particula virală a oncovirusurilor conținînd o asemenea reverstranscriptază (Temin și Baltimore, 1972) își replică ARN fără a determina moartea celulei

Scanned with OKEN Scanner

gazdă, dar ducînd la transformarea sa malignă. Reproducerea particulelor virale în celulele infectate nu este obligatorie, cu toate că informația genetică a virusului este regulat transmisă în timpul mitozei, la celulele fiice cu ajutorul unei structuri genetice care deține informația genetică atît pentru multiplicarea virusului, cît și pentru transformarea malignă a celulei gazdă. Această structură se numește provirus. El este o copie ADN a genomului viral ARN, integrată în genomul celulei gazdă, fapt dovedit prin experiențe de hibridare prin care s-a constatat că se pot obține molecule hibride între ARN virionului și o parte din ADN celular corespunzătoare locului în care s-a integrat ADN provirusului. Faptul că provirusul este o structură ADN și nu o formă replicativă ARN a fost dovedit și în experiențe cu actinomicină D și cu dezoxiribonuclează care, spre deosebire de ribonuclează, inactivează provirusul.

În procesul replicării leucovirusului are loc mai întîi transferul informației genetice virale de la ARN viral la ADN. Monocatena ADN sintetizată pe matriță de ARN viral este convertită în forma bicatenară și devine provirus prin integrarea sa într-unul sau două situri ale unuia sau doi cromozomi ai celulei gazdă. În procesul de multiplicare celulară ADN proviral se replică sincron cu ADN gazdă. *In vitro*, sinteza ADN direcționată de ARN virionului lizat este dependentă de prezența ionilor bivalenți, prezentînd un optim la $p\mathrm{H} = 8$ și temperatura de 37—40 °C pentru oncovirusurile mamiferelor și 40—45 °C pentru cele aviare. De asemenea, reacția *in vitro* necesită și un agent reducător precum este ditiotreitolul sau mercaptoetanolul. ADN sintetizat are constanta de sedimentare 10 S. El este monocatenar, dar prezintă și porțiuni dublu-catenare, unele de tip *hairpin*, care determină o renaturare rapidă a unei fracțiuni de ADN sintetizat de polimeraza din virionii mieloblastozei aviare (AMV). Se poate constata că produsul de sinteză ADN are o mărime mai redusă (5—8 S) comparativ cu ARN 70 S al leucovirusului folosit ca matriță. Acest fapt sugerează că în procesul reverstranscrierii se copiază numai anumite regiuni ale matriței heteropolimerice, ceea ce este o situație similară cu subreplicarea ADN la eucariote. În prezent nu se cunoaște semnificația subreplicării ADN leucovirusului.

În stadiile timpurii ale reverstranscrierii (fig. 38) se sintetizează un ADN monocatenar. Ulterior, cînd începe să fie degradată matrița ARN, se sintetizează un ADN bicatenar care va reprezenta provirusul. Nu se știe cine servește ca primer pentru sinteza celei de-a doua catene ADN, cum necunoscut rămîne și mecanismul de separare a matriței ARN de catena ADN complementară. Este presupus fie un proces mecanic de îndepărtare, fie un proces enzimatic de digestie prin activitatea ribonucleazică H a ADN-polimerazei virionale care disociază specific catena ARN din hibridul ARN-ADN pe măsură ce se desfășoară reacția de polimerizare, eliberîndu-se astfel monocatena

Scanned with OKEN Scanner

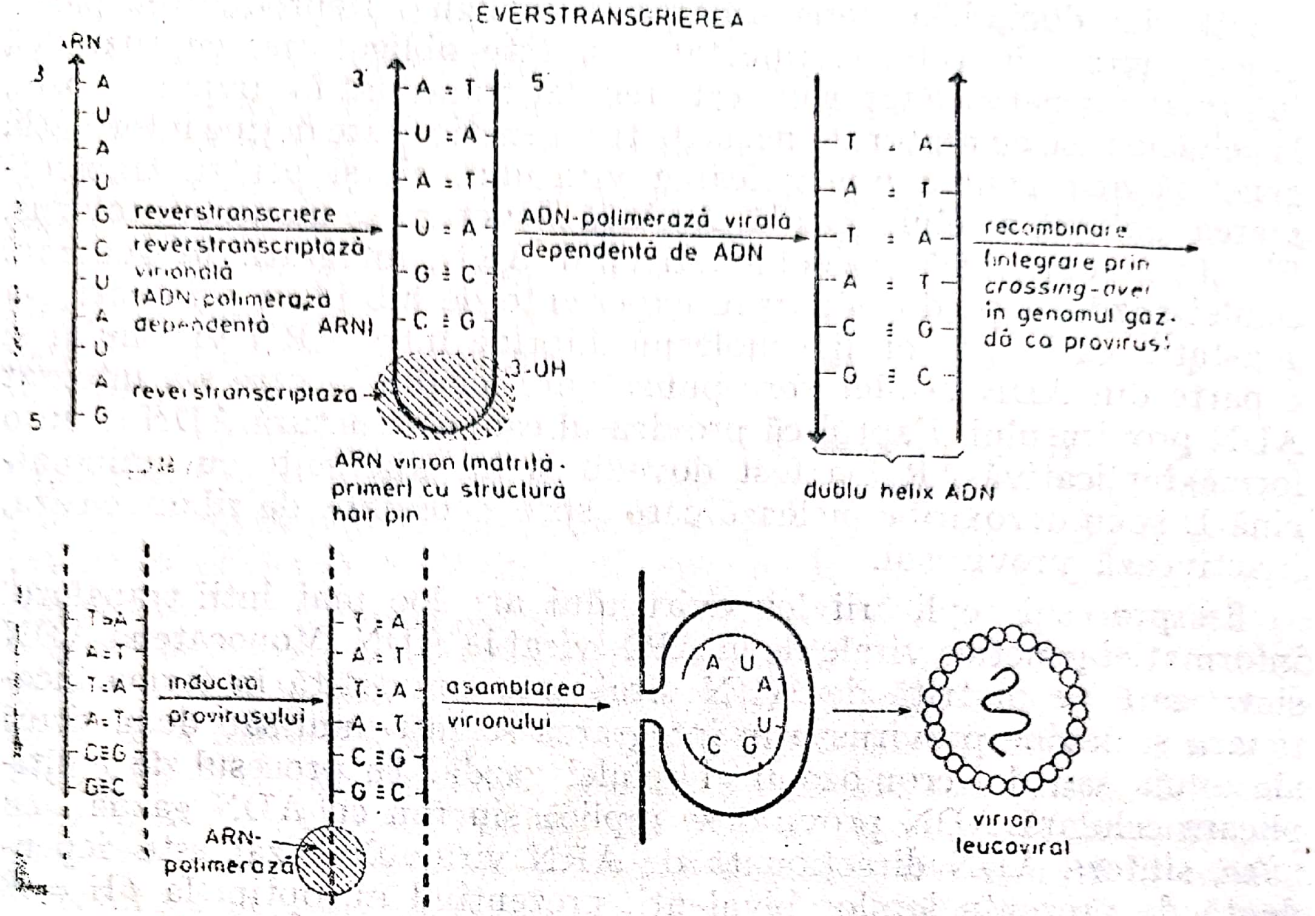


Fig. 38. **Reverstranscrierea.**

ADN ce servește ca matriță pentru sinteza unei catene complementare a structurii bicatenare a ADN proviral în cadrul reacției endogene. Activitatea ribonucleazică H a revertazei virionale se manifestă atît ca exonuclează 5′ → 3′, cît și ca exonuclează 3′→5′. Ribonucleaza H apare ca o RN-ază dependentă de un hibrid molecular ADN—ARN. Integrarea ADN proviral în ADN gazdă, sinteza discontinuă de ADN pe matriță ARN și disocierea matriței ARN sînt dependente de enzime dezoxiribonucleazice și ribonucleazice ca și de ADN-ligaze pe care virionii leucovirusurilor murine și aviare le posedă. În leucovirusurile animale s-au identificat de asemenea ATP-ază, nucleotid-kinază și fosfatază, ca și alte activități enzimatice. Nu poate fi exclusă posibilitatea ca aceste activități enzimatice să fie contaminanți celulari. Ribonucleaza H este însă o parte integrantă a revertazei.

În prezența unei proteine destabilizatoare de tip unwindază, activitatea de reverstranscriere a reverstranscriptazei purificată din RSV este intensificată încît sintetizează un ADN complementar la aproape întregul genom viral (Lee și Hang, 1977). În virionii AMV a fost identificată o enzimă cu proprietățile unwindazei de *E. coli* sau fag T_4.

În vederea multiplicării leucovirusului este necesar un transfer de informație genetică virală de la ADN proviral la ARN viral (fig. 38),

sintetizîndu-se sub cataliza unei ARN-polimeraze specifice noi molecule de ARN viral. Este vorba de o transcriere a ADN proviral, transcriptele reprezentînd genomul ARN al leucovirusurilor progene.

Existența unei faze ADN în ciclul de viață al unui ribovirus este avantajoasă pentru acesta. El infectează celula ca ARN și rămîne în stare latentă ca ADN (provirus). Acest provirus poate fi activ fără excizia sa din genomul gazdă (Temin, 1971).

4. *Teoria oncogenei.* Virusurile oncogene ARN prezintă, după unii virologi, o situație aparte. Ele sînt defective, ARN al acestora, sub forma reverstranscrisă de ADN, devenind o parte componentă a unui cromozom eucariot, reprezentînd în stare integrată o oncogenă. Aceasta ar dirija sinteza unui produs proteinic care condiționează transformarea malignă a celulei gazdă. Potrivit ipotezei oncogenei (Huebner și Todaro, 1969), toate celulele conțin în ADN informația necesară spre a specifica genomul complet al unui oncovirus (virogena), care se transmite în descendență, anumite funcții ale sale putîndu-se ocazional exprima sub forma transformării maligne. Cît timp aceste virogene se află sub control celular ele sînt păstrate în cromozomul gazdă în stare represată. Dezechilibrul celular provocat de iradieri sau de factori chimici carcinogeni ar putea duce la pierderea exercitării controlului respectiv asupra virogenei, permițînd expresia funcției acesteia — transformarea malignă a celulei gazdă.

În condiții obișnuite, aceste oncogene nu pot dirija sinteza unor particule virale. Numai dacă celulele transformate malign sînt întîmplător infectate și de un virus ajutător, oncogen, se poate ajunge ocazional, prin învelire în urma înmuguririi membranei celulare, la formarea de virioni. Există și ideea că uneori virogenele pot aduce avantaje selective organismelor, eventual asemenea virogene au condiționat chiar ritmul evoluției în lumea vie. Existența unei ADN-polimeraze dependente de ARN și a unui ARN de greutate moleculară mare în țesuturile transformate malign a fost dovedită de către Gulati și colab. (1972). Datele actuale nu permit să se stabilească cu certitudine dacă inducția leucovirusului este un rezultat al derepresiei provirusului sau dacă inducția reprezintă în realitate anumite procese recombinatorii sau mutaționale care duc la formarea genomului viral. În ambele cazuri activitatea ADN-polimerazei virionale ar fi codificată de ADN celular. Oricum, ADN-polimeraza, care copiază ARN viral, nu poate face parte din sistemul ADN-polimerazic major al celulei gazdă.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul VI

BAZELE MOLECULARE ALE ORGANIZĂRII GENETICE

1. Organizarea genomului viral. Virusurile sînt particule nucleoproteinice, înzestrate cu continuitate și mutabilitate genetică. Virusurile se deosebesc de toate celelalte sisteme biologice prin faptul că în particula virală se află, ca material genetic fie ADN (dezoxiribovirusuri), fie ARN (ribovirusuri), niciodată ambele categorii de acid nucleic. De asemenea, ca o trăsătură esențială a virusurilor este absența totală a oricărui sistem de sinteză proteinică. Virionul — forma extracelulară sub care se găsește virusul — poate include una sau cîteva enzime legate de procesul de inițiere a infecției, dar insuficiente spre a asigura reproducerea sa. Din această cauză, spre deosebire de toate celelalte sisteme biologice, virionul nu rezultă, ca atare, direct, dintr-un virion preexistent, sistemele celulare chiar și cele mai mici, ce se apropie ca dimensiune de virusurile mai mari (*vaccina* sau *smallpox*) cum ar fi agenții psitacozei, tracomei și limfogranulomatozei venerice, reproducîndu-se prin diviziunea celulei preexistente.

Virusurile sînt paraziți de nivel genetic, a căror reproducere este dependentă de aparatul de sinteză al celulei gazdă, căreia virusul infectant îi oferă planurile arhitecturale ale viitoarelor particule virale, codificate în ADN sau ARN viral, care reprezintă genomul viral sau cromozomul viral. Genomul viral reprezintă genomul cu dimensiunea cea mai mică dintre toate genoamele cunoscute în sistemele biologice, studiul său permițînd stabilirea limitelor între care poate funcționa un genom, ca și caracterizarea integrală a informației genetice a unui genom funcțional. Dimensiunea genomului viral se înscrie între cîteva mii și 250 000 nucleotide, corespunzînd la un număr de gene care variază între 10 și cîteva sute. Cel mai mic conținut de acid nucleic (ARN) se află la virusul satelitic al necrozei tutunului, și anume de $1{,}3 \times 10^3$ nucleotide iar cel mai mare conținut de acid nucleic (ADN) se află la virusul *Pox*, fiind de $5{,}3 \times 10^5$ perechi nucleotide (Sparrow și colab., 1972 (tabelul 7, v. sfîrșitul lucrării). Greutatea moleculară a ADN viral variază între 10^6 și 10^8 daltoni, mult mai mică decît a ADN de *E. coli* ($2{,}2 \times 10^9$ daltoni). Bacteriofagul $\Phi \times 174$ conține un ADN monocatenar cu o secvență de circa 5375 nucleotide, codificînd 5—10 proteine.

Scanned with OKEN Scanner

La ADN al bacteriofagului T_4, 30% din timină este înlocuită cu uracilul, astfel că ADN-ul său poate fi sintetizat numai în celulele de *E. coli* deficiente în UTP-ază și uracil ADN-glicozidază, enzime care scot resturile uracil din ADN (Warner și Duncan, 1978). La acest fag au putut fi estimate, pe baza studiului mutanților condițional-letali, un număr de 70 gene.

ARN viral prezintă o greutate moleculară care variază între 10^6 și 10^7 daltoni. La fagul R_{17} întreaga informație genetică este înscrisă într-o moleculă de ARN de circa 3300 nucleotide lungime ce poate codifica 3—4 proteine virale, prin analiza genetică evidențiindu-se trei grupe de complementaritate. Genomul bacteriofagilor este organizat sub formă de ADN monocatenar ($\Phi \times 174$, ΦR, fd, S_{13} etc.), circulară ($\Phi \times 174$) sau filamentoasă — liniară (fd, Pf_1), de ADN bicatenar (fagii din seria T) sau ARN monocatenar (MS_2, R_{17}, f_2, $Q\beta$). Bacteriofagii cu molecule monocatenare de acid nucleic prezintă în timpul replicării forme replicative bicatenare.

Cel mai cunoscut genom viral este cel al fagului $\Phi \times 174$. Cantonat într-o capsidă icosaedrică, acesta are un diametru de 165 Å, prezentînd o greutate moleculară de $1{,}7 \times 10^6$ daltoni. Raportul A/T este de 1/1,33 iar raportul C/G = 0,75/0,98, raporturi care sînt caracteristice structurii sale monocatenare și absenței împerecherilor de baze specifice (Sinsheimer, 1959). În secvența sa se află lungi porțiuni ce cuprind pirimidine grupate cîte 9—11, care alternează cu secvențe purinice grupate cîte 13—14 nucleotide. Un genom cu ADN monocatenar circular se întîlnește și la virusurile plantelor, cum ar fi cel al variegării porumbului, al mozaicului auriu al tomatelor, al mozaicului euforbiei, virusul latent cassava, virusul răsucirii vîrfului sfeclei și virusul mozaicului galben-auriu al fasolei (Harrison și colab., 1977). Genomul fagului λ este reprezentat de o moleculă de ADN bicatenar cu greutate moleculară $3{,}0 \times 10^6$ daltoni. Capetele 3′ și 5′ ale macromoleculei sale sînt adezive (coezive), prezentînd secvențe lungi de baze complementare pe baza cărora, prin împerechere, are loc circularizarea formei lineare. A fost stabilită secvența de baze a acestor capete adezive (lipicioase) (Wu și Taylor, 1971).

Structuri genomice asemănătoare se întîlnesc și la fagii Φ 80, seria impară T și P_{22}. Conversia formei liniare în forma circulară are loc în procesul de replicare a genomului. În celula gazdă genomul viral poate suferi modificări chimice de tip metilare, făcîndu-l astfel accesibil endonucleazelor de restricție. În cadrul genomului viral au fost evidențiate secvențe de tip palindromic cu localizări diferite. La adenovirus asemenea secvențe se află lîngă situl terminal al replicării (Padmanabhan și colab., 1976). Molecula de ARN a fagului R_{17} are la nivelul unei secvențe de 387 de nucleotide mai multe regiuni complementare. Cînd apar împerecheri în cadrul acestor regiuni se formează

Scanned with OKEN Scanner

bucle de tip *hairpin*, care conferă întregului segment cromozomal aspectul unei flori (modelul floral al genomului viral (fig. 39 A).

Genomul viral ARN poate deci prezenta structuri de tip *hairpin* iar replicaza virală, ce poate împrumuta unele subunităţi de la gazdă avînd şi subunităţi specific virale, recunoaşte cu mare specificitate dintr-o populaţie eterogenă de molecule de ARN, genomul viral , spre a-l replica.

La eucariote se întîlnesc ribovirusuri animale cu ARN monocatenar (virusul polio-agentul poliomielitei) sau dublu-catenar (reovirus) şi ribovirusuri vegetale cu ARN monocatenar (VMT) sau, mai rar bicatenar (virusul nanismului orezului). ARN viral intact la intrarea în celulă funcţionează ca ARNm poligenic şi apoi ca matriţă pentru replicare. Reovirusul prezintă un genom alcătuit din 10 segmente bicatenare (+ —) de ARN care se replică după un model conservativ. (Herschowitz, 1977).

Un caz interesant îl oferă virusul necrozei tutunului. Molecula sa ARN are o lungime de circa 1300 nucleotide care nu asigură codificarea proteinei de înveliş, aflîndu-se sub limita admisibilă pentru cel mai mic virus complet (1500 nucleotide). Acest virus se numeşte virus satelitic, neputînd infecta celulele gazdă decît dacă se asociază cu un alt ribovirus ce are un genom de 6000 nucleotide. Replicarea ARN al virusului satelitic este dirijată de ARN-sintetaza virusului mare.

În cazul virusurilor cu ARN bicatenar, pentru o genă dată, numai una dintre cele două catene complementare îndeplineşte funcţia de ARNm. În cazul virusurilor cu ARN monocatenar, funcţia de ARNm pentru sinteza ARN-sintetazei este îndeplinită de catena „+" din particula virală matură, iniţiindu-se astfel replicarea ARN viral monocatenar (Stavis şi August, 1970). ARN al virusului poliomielitei — Poliovirus — este o monocatenă de 7 500 nucleotide. El are la capătul 3′ o secvenţă poli — A de 75 resturi adenilice şi funcţionează atît ca ARN genetic, cît şi ca ARNm, informaţia pe care o conţine fiind tradusă direct în proteină fără a mai interveni o treaptă intermediară de transcriere într-o altă catenă ARN. Genomul viral are două tipuri de funcţii: timpurii şi tîrzii. Funcţiile timpurii implică replicarea, iar cele tîrzii traducerea sa în cadrul sintezei componentelor capsidei şi a altor componente.

Programarea în timp a funcţionării genelor virale este determinată de ordinea de înşiruire a acestora în cromozomul viral. Într-un moment dat al ciclului viral sînt transcrise genele care dirijează sinteza unor produşi necesari în acel moment. De exemplu, sintetizarea lizozimului la începutul ciclului viral ar fi inoportună pentru desfăşurarea infecţiei virale, distrugînd celula înainte de a se fi realizat multiplicarea virală, ceea ce ar echivala cu un ciclu viral abortiv.

Scanned with OKEN Scanner

Un caz particular îl prezintă fagul T_5. La acesta pătrunderea ADN în celula gazdă se desfășoară în două etape. În prima etapă pătrunde circa 8% din ADN al genomului fagic care va fi transcris într-un ARNm. Acest ARNm dirijează sinteza unei proteine ce condiționează pătrunderea restului genomului. Configurația foarte diversă a moleculei acidului nucleic din genomul viral este prezentată în figura 39 B.

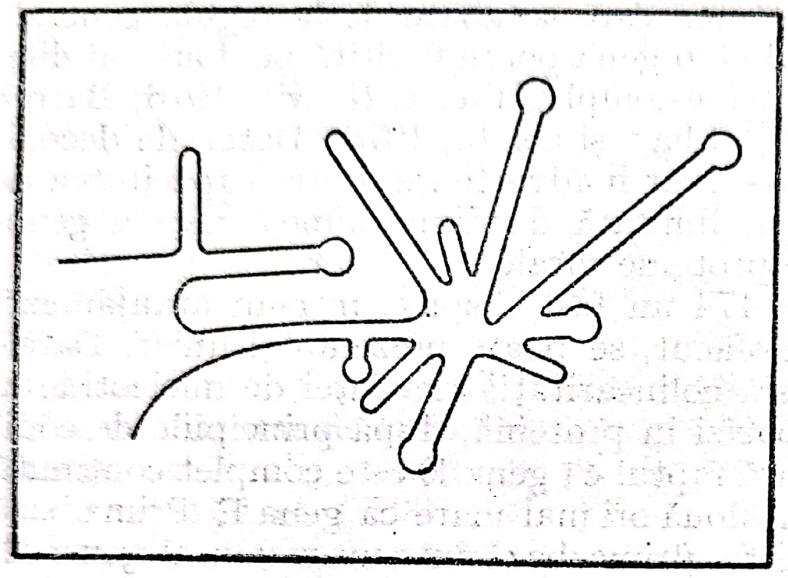
În ultimul timp, la bacteriofagii $\Phi \times 174$ și G_4, ca dealtfel și la SV40, s-a evidențiat un fenomen care se abate de la regula generală a citirii genomului, în sensul că o genă poate fi citită pe două căi diferite, producîndu-se două proteine complet diferite (Lewin, 1976; Barrell și colab., 1977 ; Szekely, 1978, Shaw și colab., 1978). Datele de decodificare au atras atenția asupra unor inadvertențe dintre capacitatea de codificare a genomului viral, limitată de dimensiunea mică a genomului său, și cantitatea de proteine virale sintetizate.

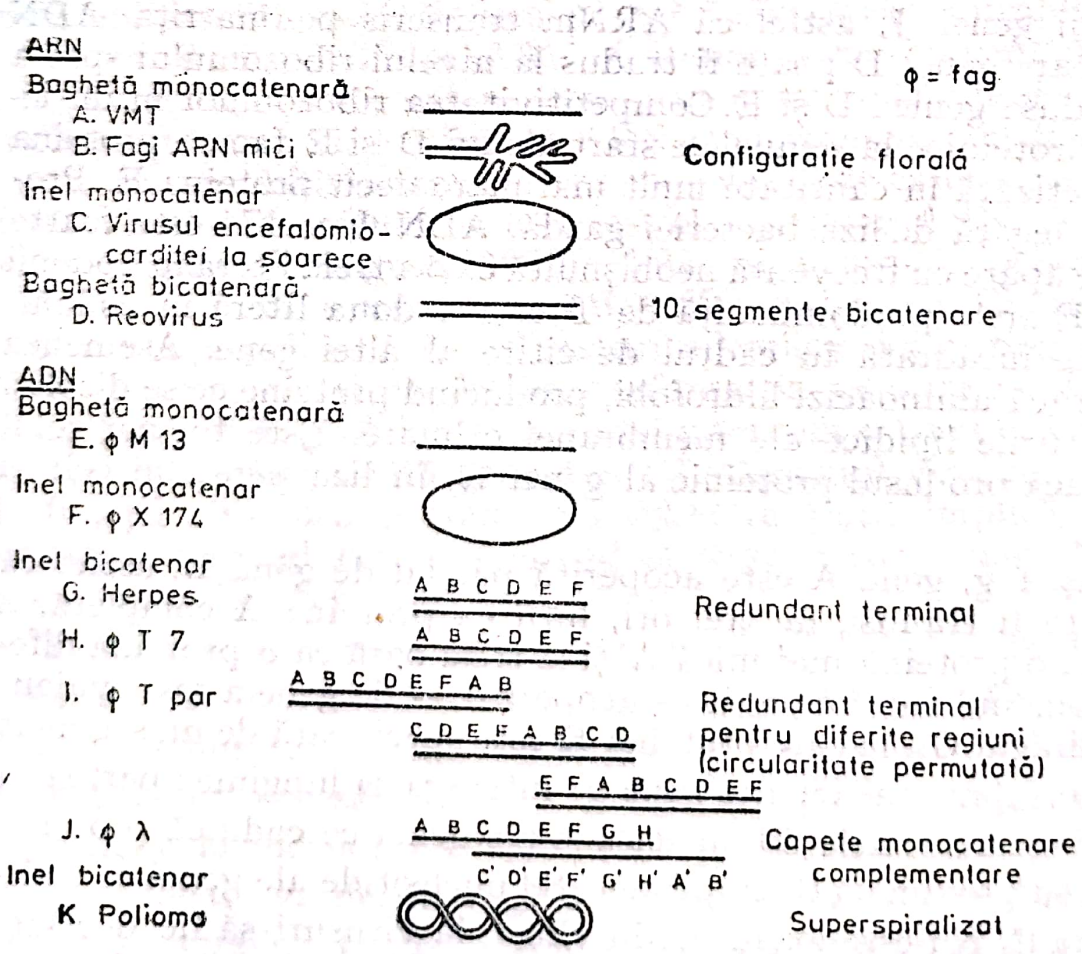
Cele 9 gene ale lui $\Phi \times 174$ au fost dispuse într-un aranjament, circular (fig. 39 C), care, desfăcut, se poate prezenta și liniar. Datele de secvențiere și de analiză a colinearității secvenței de nucleotide în ADN și secvenței de aminoacizi în proteină, după principiile de codificare 3 :1, au scos în evidență faptul că gena E este complet conținută în cadrul genei D care este de două ori mai mare ca gena E. Prima bază a unui codon din gena D este ultima bază într-un codon al genei E. Semnalul stop al transcrierii genei D acoperă cu o bază semnalul start al transcrierii genei J, astfel că ARNm transcris pe matrița ADN corespunzătoare genei D poate fi tradus la nivelul ribozomului spre a da două produse genice D și E. Competitivitatea ribozomilor în inițierea sintezei proteinice la semnalele start ale lui D și E fac ca proteina D să fie sintetizată în cantitate mult mai mare decît proteina E. Proteina E este legată de liza bacteriei gazdă. ADN $\Phi \times 174$ este foarte bogat în T ce apare cu frecvență neobișnuită ca o a treia literă în codonii ADN. Gena E are o predominanță de T ca o a doua literă în codoni, deoarece este încadrată în cadrul de citire al altei gene. Asemenea codoni specifică aminoacizi hidrofobi, producînd proteine ce se dizolvă ușor în straturile lipidice ale membranei celulare. Este tocmai rolul pe care îl joacă produsul proteinic al genei E, în liza peretelui celulei gazdă.

La același fag, gena A este acoperită parțial de gena B, astfel că gena A poate fi tradusă de trei ori, întîi ca proteina A completă, a doua oară ca o proteină mai mică A′ și a treia oară ca o proteină diferită B. Fenomenul suprapunerii — acoperirii — de gene a fost evidențiat și la colifagul G_4, la care proteina K este specificată de un segment ADN care se suprapune cu alte gene pe întreaga sa lungime : partea sa proximală 5′, cu ultimele 86 nucleotide ale genei ce codifică proteina A și partea sa proximală 3′ cu primele 89 nucleotide ale genei ce codifică proteina C. Nu este exclus ca în viitor, la virusuri să fie decelate

Scanned with OKEN Scanner

și alte aspecte caracteristice care se abat de la regulile geneticii moleculare. Fenomenul suprapunerii de gene este o adaptare a genomului viral, cantonat într-un container mic (capsida), nevoit ca pe o lungime limitată de ADN să înscrie o informație ereditară totuși complexă.





Scanned with OKEN Scanner

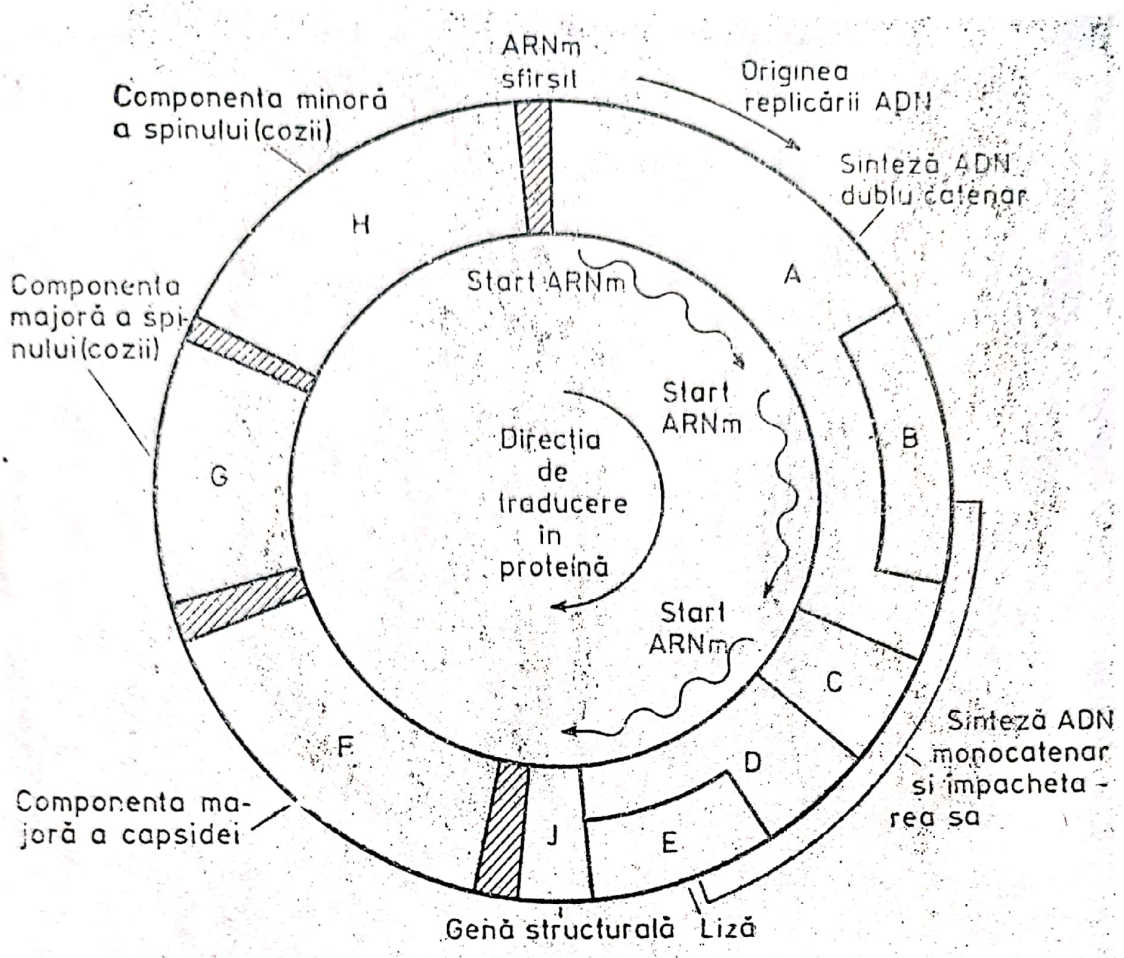


Fig. 39. A — **Modelul floral pentru molecula de ARN a unor ribovirusuri.** B — **Configurațiile posibile ale macromoleculelor de acid nucleic din genomul viral.** C — **Harta genetică refăcută a fagului ΦX174 cu gene acoperite** (gena B în cadrul genei A și gena E în cadrul genei D). Regiunile haşurate sînt necodificatoare. Harta indică lungimea relativă și poziția fiecăreia din cele 9 gene virale (A—J). Transcrierea, traducerea și replicarea se desfășoară în sensul acelor de ceasornic. (A și B după I. H. Herschowitz, *Principles of Genetics*, MacMillan Publ. Co. Inc., New York, 1977).

2. **Organizarea genomului bacterian.** Bacteriile au structură celulară de tip procariot. Materialul genetic reprezentat de ADN necomplexat cu histone este localizat la nivelul nucleoidului bacterian (foto XI) care nu este delimitat față de citoplasmă printr-o structură membranară, astfel că ADN bacterian vine în contact direct cu citoplasma. Nucleoidul (cromozomul) bacterian este un dublu-helix circular de ADN care reprezintă 3—4% din greutatea celulei. Cantitatea de ADN la *E. coli*, de 10^{-2}—$4{,}15 \times 10^{-3}$ picograme, corespunde la circa 3×10^6 perechi de baze, avînd o greutate moleculară de $2{,}2$—$2{,}7 \times 10^9$ daltoni. La *Salmonella typhimurium* se află 4×10^{-3} pg., iar la *Bacillus megatherium*, 7×10^{-2} pg.

Circumferința cromozomului la *E. coli* este de 1100—1 400 μm (Cairns, 1963, 1964). *Mycoplasma hominis* are un genom mult mai redus, ADN-ul său avînd o lungime de contur de 265 μm. Se ad-

Foto XI — **Structura electronomicroscopică a celulei procariote:** A — *E.coli*; B — un contaminant bacterian al algelor albastre-verzi; C — celulă de algă albastră-verde (cianobacterie) în care se remarcă starea fibrilară a nucleoidului (Nu). A—X 28 200, B—X 14 600; C—X 9 800 (B și C după L. Gavrilă și Grigore Mihăescu, 1980).

mite existența unei singure macromolecule de ADN per nucleoid bacterian. Există o diferență marcantă între lungimea totală a macromoleculei ADN bacterian (foto XII) de peste 1 mm, cu mult mai mare decît lungimea celulei — și diametrul nucleoidului (1 μm). Aceasta

Scanned with OKEN Scanner

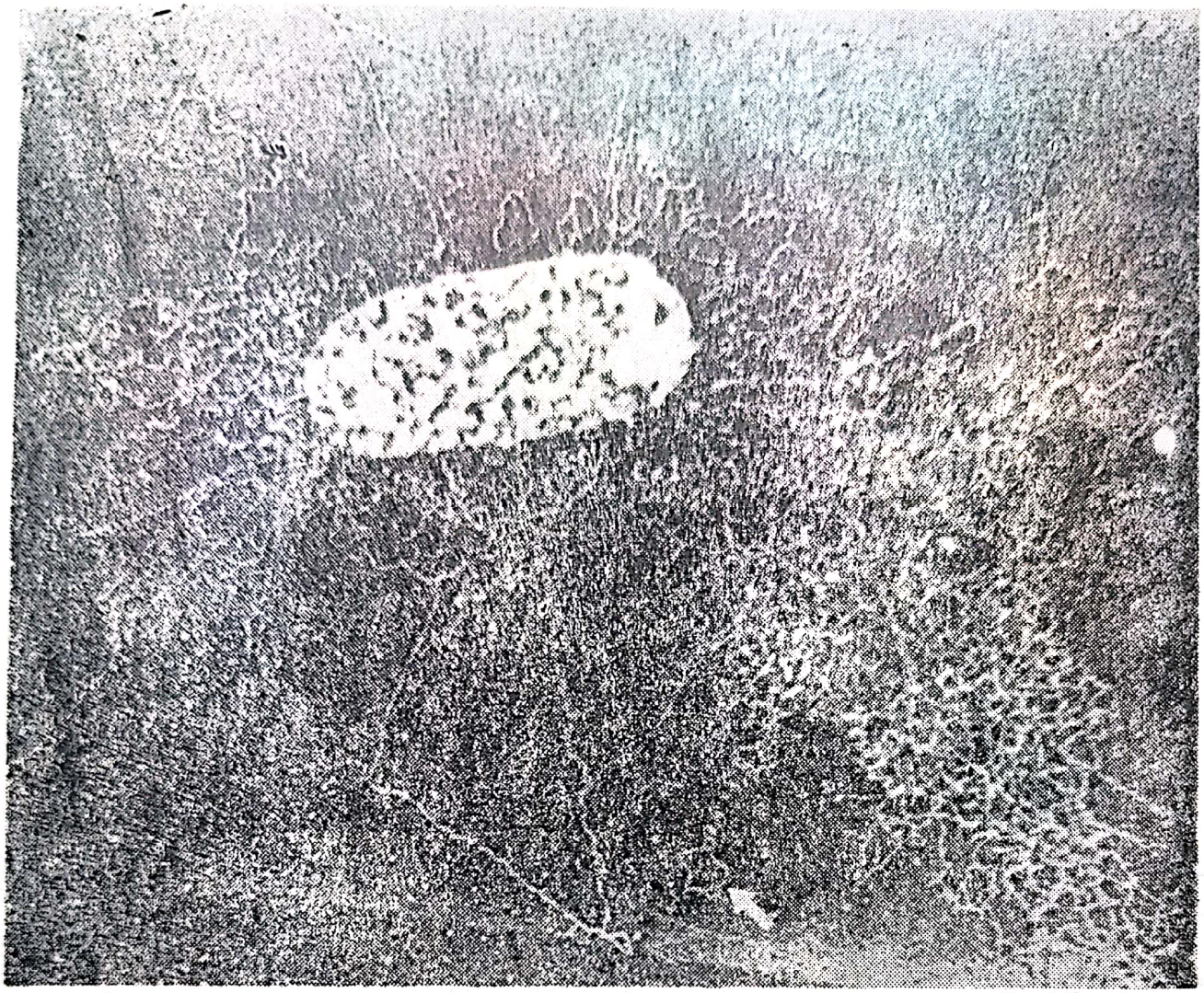


Foto XII — **ADN de E.coli ieșit în afara celulei în urma lizei chimice a peretelui celular.** Cea mai mare parte a ADN se află sub forma unei singure molecule mari, dublu-catenare de ADN, care constituie cromozomul bacterian. În plus, bacteria posedă una sau mai multe molecule circulare bicatenare de ADN, reprezentînd plasmidele; o asemenea plasmidă se află în partea de jos a electronografiei (săgeata) (după Griffith, din Grobstein, 1977).

arată că în nucleoid ADN se află într-o stare compactă, condensată prin pliere și superspiralizare. Forma circulară a cromozomului bacterian nu are însă un corespondent morfologic simplu la nivel ultrastructural (foto XI). Starea condensată a ADN bacterian este stabilizată de către molecule de ARN care se află la nivelul nucleoidului (Pettijohn și Hecht, 1974). Menținerea stării de condensare a ADN bacterian reclamă o continuă sinteză de ARN. Deoarece se constată o separare exactă a cromozomilor fii bacterieni și nu este împiedicată nici replicarea, nici transcrierea, înseamnă că împachetarea ADN bacterian este ordonată (Worcel și colab., 1974). În lipsa aparentă a proteinelor bazice histonice, marea încărcătură ionică a ADN bacterian este neutralizată de prezența unei mari cantități de poliamine, spermina și

Scanned with OKEN Scanner

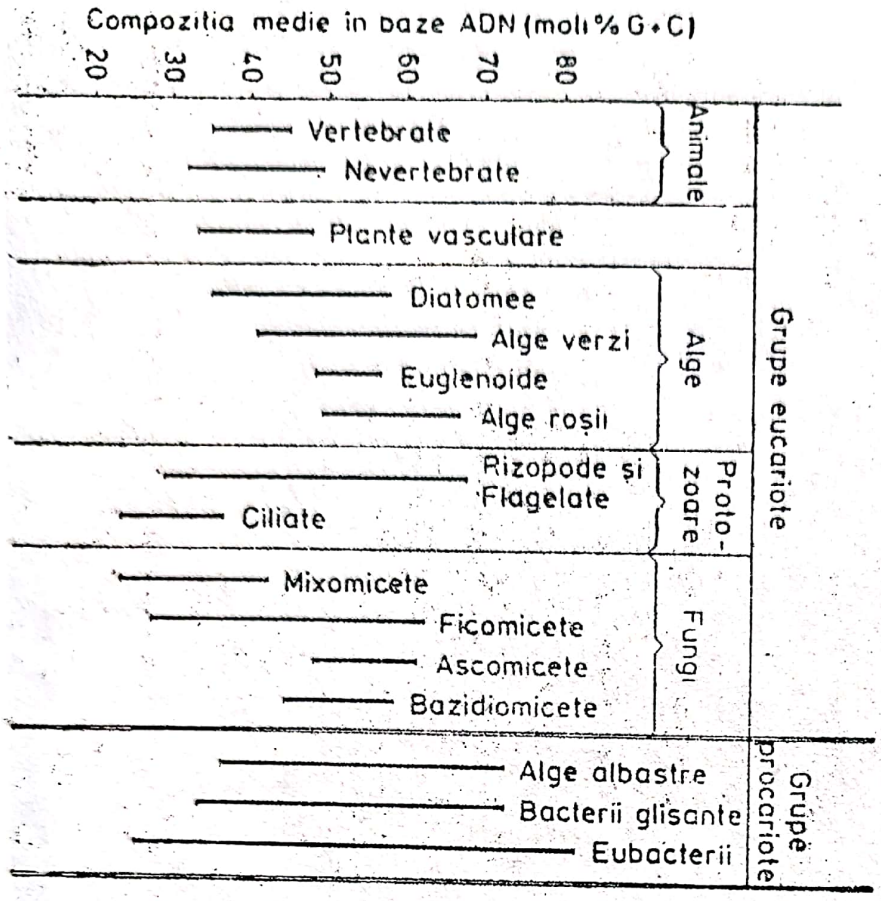


Fig. 40. **Variația compoziției medii în baze (% moli G+C) caracteristică grupelor biologice majore** (după Stanier și colab., 1970).

spermidina. Analiza genetică atestă existența la bacterii a unui singur grup de lincaj care are ca suport fizic cromozomul circular bacterian.

Genomul bacterian prezintă limite mari de variație (35—75%) a conținutului G+C (fig. 40). Diversitatea evolutivă a bacteriilor exprimată prin compoziția de baze a ADN denotă marea lor vechime evolutivă. Ca o particularitate în organizarea genomului bacterian apare existența unor elemente genetice care nu sînt virusuri, ci reprezintă segmente de ADN cu lungime de 800—2000 perechi de baze ce au capacitatea de a se insera în cromozomul bacterian. Ele au fost numite elemente de inserție sau segmente de inserție (IS) și în stare integrată determină deleții în ADN bacterian adiacent, manifestînd caracter mutagen și capacitate de a altera expresia genică, de a iniția sau stopa transcrierea ADN gazdă. Au fost descrise patru segmente de inserție, IS_1, IS_2, IS_3, IS_4. IS_1 are o lungime de 800 perechi nucleotide, celelalte avînd cîte 1400 perechi nucleotide. Ele se pot integra atît în cromozomul bacterian, cît și în plasmidele bacteriene. IS_2 și IS_3 se integrează în plasmida F care apoi se poate integra în cromozomul principal. IS_1 se integrează în plasmida de rezistență într-un sit aflat la frontiera dintre secvența ce determină rezistența la antibiotice și secvența RTF implicată în controlul replicării și transferului acestei plasmide (Shapiro, 1977).

Elementele de inserție își pot schimba situl de integrare. De la plasmidă ele pot să „sară" pe genomul unui bacteriofag, apoi în

Scanned with OKEN Scanner

cromozomul bacterian și din nou în altă plasmidă. antrenînd cu ele gene bacteriene, fagice sau plasmidice, apărînd astfel ca elemente genetice transpozabile, dar de sine stătătoare, care păstrîndu-și intactă secvența de nucleotide au fost numite transloconi sau transpozoni (IS + un segment specific al cromozomului bacterian). Transpozonii sînt legați în special de rezistența la diferite antibiotice. Transpozonul Tn 9, de exemplu, reprezintă un segment din ADN bacterian care se termină cu IS_1 și care conferă rezistența la cloramfenicol. Transpozonii, prin intermediul segmentelor de inserție, mediază schimbarea poziției genelor din cromozomul bacterian, conferind acestor gene atributul de „săritoare".

Integrate în cromozomul bacterian sau în plasmide, elementele de inserție au fost evidențiate electronomicroscopic, apărînd ca bucle *hairpin* de tip α sau de tip α cu împerecheri parțiale. Fiind agenți de instabilitate genică și rearanjamente cromozomale (Nevers și Saedler, 1977), comutatori biologici capabili de á scoate din funcție sau de a face să intre în funcție genele învecinate, în urma integrării sau excizării lor (Cohen, 1976), segmentele de inserție de la bacterii sînt comparabile cu factorii de control de tip disociator — activator descriși de către McClintock la porumb sau cei descriși la drosofilă.

La eucariote segmentele de inserție au formă de ac de păr sau de ac de păr cu buclă. Se pare că ele au jucat un rol important în evoluție, mărind potențialul mutagen al genomului, apoi în citodiferențiere și în înscrierea secvențelor de ADN care codifică partea constantă și variabilă a moleculelor de imunoglobulină.

Un caz particular îl oferă bacteriofagul *mu* care se poate integra în orice regiune a cromozomului bacterian, transformînd orice segment din acesta într-un transpozon.

3. Organizarea genomică mezocariotă. Deși celula algelor dinoflagelate se bucură de toate atributele unei organizări eucariote, prezentînd un nucleu cu membrană nucleară, nucleol și mai mulți cromozomi, apoi organite citoplasmatice specializate, precum mitocondrii și cloroplaste, aceste alge prezintă la nivel molecular și ultrastructural o organizare genetică intermediară între procariote și eucariote, din care cauză a fost numită mezocariotă (Dodge, 1965; Gavrilă, 1976—1978). La nivel ultrastructural materialul genetic al dinoflagelatelor apare sub forma unor fibrile fine de ADN cu diametru de 30—60 Å, deosebindu-se radical de fibra nucleohistonică a eucariotelor și apropiindu-se de starea fibrilară a nucleoidului bacterian. ADN nu este complexat cu histone, iar dacă detectarea histochimică a histonelor a fost posibilă la unele forme parazite de dinoflagelate, raportul ADN-histonă este diferit de acela unitar de la eucariote tipice, fiind cu mult în favoarea ADN.

Haapala și Soyer (1973) au elaborat un model structural pentru

Scanned with OKEN Scanner

cromozomii dinoflagelatelor din care se poate desprinde aranjamentul anortospiral de figuri „8" al unor cromatide circulare care au 25—30 μm la *Crypthecodinium cohnii* și 120—160 μm la *Prorocentrum micans*. Superspiralizarea și împachetarea ADN cromozomal pot fi menținute și reglate de un complex schelet ribonucleoproteinic similar celui de la bacterii.

Se admite că la baza cromatidelor circulare ale cromozomului mezocariot a stat o structură concatemeră lungă, de tipul formelor replicative ale fagilor λ și T_7. O asemenea structură apare ca strămoș al tuturor tipurilor structurale de cromozomi uninemici. La nivelul cromozomului mezocariot ADN apare sub forma unei macromolecule circulare cu structură terțiară ce conferă cromozomului o organizare periodică. În lipsa centromerului, membrana nucleară joacă un rol esențial în separarea cromozomilor mezocariotici, aceștia fiind atașați permanent la membrana nucleară.

Cromatina dinoflagelatelor conține ADN, ARN, proteine acid solubile a căror proporție față de ADN este de 0,02—0,08% și proteine acid insolubile (Rizzo și Nooden, 1974).

Proteina bazică (acid solubilă) prezintă un raport aminoacizi bazici/aminoacizi acizi de 1,3, deosebindu-se de majoritatea fracțiunilor histonice prin prezența în ea a cisteinei și a aminoacizilor aromatici. Ea este prezentă în cromatina celulelor aflate în faza logaritmică, dar lipsește din cromatina celulelor aflate în faza staționară. Din această cauză, deși bazică, această proteină nu este considerată o histonă. Cea mai mare parte a acestor proteine aparțin matrixului de activitate genică, deoarece conferă macromoleculei ADN stabilitate față de denaturare. Dinoflagelatul parazit *Syndinium* sp. se deosebește principial de dinoflagelatele libere prin aceea că în cromatina sa raportul proteine bazice /ADN este, ca și la eucariotele tipice, unitar (Ris și Kubai, 1974).

În ADN al dinoflagelatelor a fost evidențiată 5—OH-metil dezoxiuridina care înlocuiește timina în proporție de 40%. De asemenea, se mai află și 5 metilcitozina. La *Crypthecodinium cohnii* ADN nuclear are o densitate de 1,695 g/ml, ADN cloroplastic are 1,688 g/ml, iar cel mitocondrial 1,695 g/ml. Studiile de denaturare — renaturare termică (Allen și colab., 1974) a ADN la *Gyrodinium resplendens* și *C. cohnii* evidențiază existența a două clase discrete de secvență: 68% din ADN prezintă secvențe unice și 32% prezintă secvențe repetate. Cantitatea de ADN pe nucleu este neobișnuit de mare la dinoflagelate: de la 6,9 pg ADN/celulă la *C. cohnii* pînă la 200 pg ADN/celulă la *Gonyaulax polyedra* comparativ cu *E. coli* care are 10^{-2} pg ADN/celulă.

Cantitatea de ADN a dinoflagelatelor este mult mai mare chiar decît aceea a genomului haploid uman. Dată fiind condensarea permanentă a cromozomilor, începutul activității genice la dinoflagelate

Scanned with OKEN Scanner

este precedat de despiralizarea cromatidelor sub forma unor bucle în zona locilor genici activi în transcriere, buclele fiind demascate prin tratamentul cu pronază.

În ciuda particularităților de organizare genetică care le apropie de procariote, dinoflagelatele prezintă proces sexuat, meioză și recombinare genetică desfășurate după mecanismele tipice eucariotelor (Tuttle și colab., 1973; Roberts și colab., 1974, Tuttle și Loeblich, 1974; (Gavrilă, 1976—1978).

4. **Organizarea genomului eucariot.** Materialul genetic al eucariotelor este închis într-un spațiu genetic reprezentat de nucleu. Programul genetic este repartizat pe mai mulți genofori — cromozomii, existînd mai multe grupe de înlănțuire a genelor. Comunicarea nucleu-citoplasmă, incluzînd și schimbul de molecule informaționale, se realizează la nivelul porilor nucleari (annuli). Spre deosebire de procariote, la eucariote ADN este permanent asociat cu histone, din care cauză materialul genetic al eucariotelor apare sub forma unor fibre nucleohistonice cu un diametru de 100—200 Å, deosebindu-se frapant de fibrilele fine de ADN de la procariote care au circa 20—25 Å diametru. Separarea produșilor de replicare în celulele fiice se face prin intervenția unui aparat fusorial, apărînd totodată la nivelul cromozomului eucariot o regiune specializată — centromerul (cinetocorul) pentru atașarea la fibrele fusului de diviziune. În nucleu se diferențiază un organit — nucleolul — sediul sintezei ARNr și asamblării ribozomilor. Substanța nucleară, cromatina, apare ca un complex molecular alcătuit din ADN, histone, proteine nehistonice, lipide, ARN și ioni Ca^{++}. Ea suferă un ciclu regulat de condensare — decondensare, cu individualizare de cromozomi în faza de transport și pierderea individualității în interfază, cînd se desfășoară procesele fundamentale ale activității ADN, replicarea și transcrierea.

Cromatina are două stări diferite: eucromatina — caracterizată prin euciclie (condensare și colorare în timpul diviziunii, decondensare în interfază) și heterocromatina caracterizată prin alociclie și heteropicnoză (condensare și colorare în tot ciclul celular).

Celula eucariotă are organizare multigenomică existînd pe lîngă genomul nuclear, genomul mitocondrial, genomul plastidial și, posibil, genomul granulilor bazali. Ierarhia organizării genomice începe de la perechea de nucleotide și ajunge la genom ca întreg (John și Lewis, 1975).

1. *ADN eucariotic.* (a) *Cantitatea de ADN la eucariote.* Cantitatea de ADN la eucariote este mult mai mare decît la procariote (tabelul nr. 8), celula eucariotă avînd un conținut informațional mult mai mare comparativ cu al particulei virale sau al celulei procariotelor (Ris și Kubai, 1970; Nagl, 1975, 1977; Edström și Lambert, 1975). Lungimea totală a cromozomilor umani este de 650—680 μm, pe cînd

Scanned with OKEN Scanner

ADN total al unei celule umane are o lungime de 2 m, astfel că unui cromozom uman îi corespunde în medie 4,3 cm de ADN, de unde necesitatea mai multor puncte de inițiere pentru o replicare rapidă a ADN unui cromozom eucariotic (Blumenthal și colab., 1974). Un cromozom uman de lungime medie are circa 10^8 perechi de baze ADN, adică de circa 25 ori mai mult decît cromozomul de *E. coli* (4000 kilobaze). Lungimea dublei elice ADN conținută de un cromozom uman este de 40 000 μm. Ea este cantonată într-un cromozom metafazic de circa 4 μm lungime, ceea ce înseamnă că este înalt condensată, respectiv împachetată foarte strîns în fibra de cromatină.

Cantitatea de ADN crește liniar cu creșterea complexității de organizare a sistemelor biologice (tabelul 8, v. sfîrșitul lucrării), fără a exista însă o relație liniară generală între valoarea conținutului de ADN și complexitatea evolutivă. Astfel, mamiferele au de regulă 2—3 pg ADN/genom haploid, pe cînd amfibienii și angiospermele prezintă un conținut de ADN cuprins între 1 și 100 pg (Price, 1976).

Cantitatea minimă de ADN necesară spre a codifica structura și metabolismul unei celule eucariote se pare că se află la drojdia *Saccharomyces cerevisiae* și este de $4{,}8 \times 10^7$ nucleotide (Sparrow și colab., 1972).

La eucariote cantitatea de ADN este variabilă de la 10^8 perechi de baze, la spongieri și celenterate, la 10^9 perechi de baze, la anelide și artropode, ajungînd la 3×10^9 perechi de baze la pești și mamifere, și chiar 10^{11} perechi de baze pentru unii amfibieni cum este salamandra *Amphiuma*.

Dar diferențele în cantitatea de material ereditar nu se explică numaidecît prin diferențe în complexitatea de organizare (*Amphiuma* are mai mult ADN decît *Homo sapiens*), ci mai curînd ele au la bază diferențe în cantitatea de ADN redundant, necodificator. Astfel, la *Amphiuma*, 80% din ADN reasociază rapid după denaturare fiind deci înalt redundant. Restul de 20% renaturează încet, avînd o valoare Cot pentru o reasociere „jumătate completă" de 20 000 (mol. s)/litru, adică de șapte ori mai mare decît timpul corespunzător pentru ADN de timus de vițel. De aici rezultă relativitatea înțelegerii semnificației complexității de secvență.

Cantitatea de ADN la eucariote este variabilă în funcție de proporția de ADN repetitiv din genom, dar și datorită unor procese mutaționale de tip deleție, duplicație, precum și eliminării de heterocromatină, acest din urmă proces alături de inactivarea selectivă a unor zone din cromozom reprezentînd așa-numita silențiere a ADN (Sager și Kitchin, 1975). Cum majoritatea căilor metabolice din celula eucariotă se află și în celula procariotă și 90% din enzimele cunoscute sînt comune procariotelor și eucariotelor, explicarea excesului de ADN la eucariote are la bază repetitivitatea unor secvențe în ADN eucariot

Scanned with OKEN Scanner

implicat în special în mecanismele mult mai complexe de reglare de la eucariote.

Diferențele în cantitatea de ADN au la bază diferențe în cantitatea de ADN repetitiv, satelit, cum este cazul speciilor de drosofilă foarte înrudite, precum *Drosophila hydei*, *D. neohydei* și *D. pseudohydei*. Dar creșterea cantității de ADN s-a putut realiza și prin poliploidie și duplicație în tandem, cum este cazul la Dipnoi și Urodele, ambele grupe avînd cantități enorme de ADN.

Datele experimentale sugerează că numai o parte redusă din ADN al genomului eucariot reprezintă gene structurale, cea mai mare parte a sa nefiind transcrisă, iar diferențele foarte mari dintre specii foarte înrudite în ceea ce privește cantitatea de ADN au la bază tocmai această parte netranscrisă a ADN, implicată posibil în mecanismele de reglare.

Dacă diferența în cantitatea de ADN de la *E. coli* și de la om de ordinul a 1000 de ori se poate explica prin aceea că la om există un număr mult mai mare de gene, nu se poate da o explicație similară diferenței de circa 30 de ori în cantitatea de ADN de la amfibienii *Nectarus* și *Amphiuma* și de la om. Acesta este paradoxul valorii C a ADN eucariotic pus în prezent pe seama variației în cantitatea de ADN repetitiv, noninformațional. Excesul aparent de ADN, de fapt o încărcătură genetică (Kimura, 1968), ar mări eficiența evoluției. Uneori, pierderea de ADN de la nivelul unor loci genici, cum este cazul la locii genici *white* și *sparse* — *arista* de la drosofilă, nu afectează aparent fenotipul. Tot la fel se întîmplă și la ciliatul *Stylonichia*. Dar acest exces de ADN este necesar în linia germinală, fiind legat de realizarea recombinării genetice din meioză cu asigurarea de perspective evolutive pentru descendenți. ADN eucariot suferă modificări enzimatice sub acțiunea metilazei și dezaminazei, genele reglatoare fiind mai intens supuse metilării decît cele structurale. După unele ipoteze, diferențierea din embriogeneză implică și tranziții GC—AT induse de enzime modificatoare.

b) *Clasele de secvență din ADN eucariotic.* Cercetările din ultimul deceniu au stabilit existența în ADN eucariotic a trei clase de secvență: unice, mijlociu repetate și înalt repetate (tabelul 9, v. sfîrșitul lucrării).

Secvențele unice sînt reprezentate o singură dată în genomul haploid și reprezintă în cea mai mare parte genele care codifică proteinele. Secvențele mijlociu repetate se prezintă ca un spectru larg de repetiții de secvență, fiind implicate în mecanismele de control.

Secvențele înalt repetate apar prin repetarea de un număr mare de ori (de sute și mii pînă la milioane) la nivelul genomului haploid al unei secvențe mici. De regulă, asemenea secvențe înalt repetate nu sînt transcrise în ARN, fiind și ele în parte legate de mecanismele de control al activității genice (Rudkin și Tartof, 1974), dar funcția multor secvențe repetate rămîne deocamdată neprecizată.

Scanned with OKEN Scanner

Genomul eucariot este un genom de tip interspers, adică în care secvenţele unice codificatoare alternează cu secvenţe repetate noninformative (Davidson şi colab., 1974). O grupare de repetiţii ale unei secvenţe de pînă la 1000 nucleotide formează aşa-numitul ADN repetitiv (Britten şi colab., 1973; Pardue, 1973).

La baza originii secvenţelor repetate este pus *crossing-over*-ul inegal, dar şi o replicare aberantă a ADN, eventual o extrareplicare. Secvenţele repetate ar fi putut lua naştere printr-o translocare a secvenţelor spaţiatoare de pe un cromozom pe alţi cromozomi.

De regulă, secvenţele înalt repetate (se mai numesc şi reiterate) sînt localizate în zonele heterocromatice, apărînd uneori ca ADN satelit (Pardue şi Gall, 1970) care diferă de restul ADN prin compoziţia în baze, densitatea de plutire şi temperatura de denaturare, ca şi după cinetica renaturării.

Cineticile renaturării ADN denaturat de şoarece sînt calitativ similare cu cele prezentate de ADN de timus de viţel, numai că în acest caz, o fracţiune satelitică, reprezentînd 10%, renaturează mult mai rapid chiar decît fracţiunea redundantă a ADN din timus de viţel. Jumătate din ADN satelit de şoarece a reasociat înainte ca valoarea Cot să fie de 0,001 (mol·s)/litru, ceea ce indică faptul că moleculele acestei fracţiuni trebuie să fie prezente în mai mult de 10^6 copii per genom.

Prezenţa în ADN eucariotic de secvenţe redundante este o caracteristică universală, proporţia de ADN redundant şi multitudinea secvenţelor repetate fiind variabile şi avînd caracteristică de specie.

ADN satelit se separă ca o bandă independentă de banda principală de ADN şi denumirea sa a fost sugerată şi de epoca în care a fost descris (1968—1970), epocă dominată de zboruri cosmice şi experienţe cu sateliţi artificiali ai Pămîntului. ADN satelitic poate fi bogat în GC sau bogat în AT, din care cauză se dispune prin ultracentrifugare izopicnică de partea grea, respectiv de partea uşoară a benzii principale a ADN. Datorită marii sale uniformităţi în compoziţia în baze, ADN satelit apare în gradient de CsCl ca o bandă unimodală îngustă, care însă poate fi separată în subfracţiuni dacă se folosesc alţi gradienţi de densitate. De exemplu, ADN satelitic de la specia umană se separă în două fracţiuni bogate în AT şi alte două fracţiuni bogate în GC. Aceste fracţiuni au fost notate I—IV şi se află localizate în benzile C la nivelul centromerilor (Corneo şi colab., 1970). Pe cromozomul Y se află o secvenţă de ADN satelit III cu specificitate masculă (Bestock şi colab., 1978). Se constată o creştere a proporţiei de secvenţe repetate, începînd de la eucariotele inferioare (5,3—13,8% la drojdie şi 13,5—30% la ciuperci) şi pînă la dicotiledonate (18—85%) şi monocotiledonate (75—95%). La animale, repetitivi-

Scanned with OKEN Scanner

tatea secvențelor apare la 20—80% din ADN genomului haploid și este întîlnită de la protiste *(Euglena)* pînă la mamifere și om (Southern, 1973).

Secvențele unice dar înalt repetate au o distribuție precisă în genom, fiind localizate în apropierea centromerilor. În cazul lui *Oncopeltis*, care prezintă centromeri difuzi, acest ADN înalt repetitiv este dispersat de-a lungul cromozomilor. Secvențele intermediar-repetate, ca și cele unice, au o distribuție mult mai variabilă în genom.

ADN repetitiv la eucariote se prezintă sub forma a două tipuri de secvențe : ciclodroame sau repetiții de secvențe simple de 600—6000 perechi de nucleotide dispuse în tandem și palindroame sau repetiții în tandem invers (bisimetrie rotatorie) a unor secvențe de 300—1700 perechi de nucleotide care prezintă la mijloc secvențe asimetrice : ABC XY C'B'A'. Palindroamele apar ca rezultat al unor duplicații și inversii ale unor secvențe din ADN. Se consideră că asemenea secvențe reprezintă semnale pentru inițierea replicării și transcrierii ca și pentru controlul mutației, ele fiind recunoscute în mod specific de către polimeraze și endonucleaze de restricție. Pe baza secvențelor palindromice pot apărea configurații cruciforme în macromolecula de ADN. La *Tetrahymena pyriformis* s-au descris palindroame gigantice, chiar în cadrul genelor ARNr. Pe baza palindroamelor au loc împerecheri intracatenare cu formarea de stucturi *hairpin* ce stau la baza unei renaturări instantanee (renaturare la timpul zero) chiar la concentrații scăzute de ADN, procesul neimplicînd o reacție bimoleculară ca în cazul hibridării dintre catene complementare.

Secvențele intermediar repetate stau la baza circularizării moleculelor de ADN tratat cu exonucleaza III. Această enzimă determină incizii cu formare de capete monocatenare 3' și 5' lipicioase care, după călire la 60—65° C formează circa 15—20% structuri circulare bicatenare stabile care au fost numite inelele lui Thomas (fig. 41). Formarea inelelor Thomas are la bază secvențe repetate ciclodromice sau palindromice sau secvențe moderat repetate în tandem cu secvențe unice intersperse (Thomas, 1973 ; Lee și Thomas, 1973, Peacock și colab., 1974 ; Thomas și colab., 1974). Inelele Thomas sînt specifice eucariotelor, ADN procariotic tratat în aceeași manieră nedînd inele Thomas.

Rata de reasociere a ADN înalt repetitiv este foarte mare, existînd în cadrul său o fidelitate mai mare în formarea hibridului molecular față de secvențele intermediar repetate (Britten și colab., 1973). ADN cu secvențe intermediar repetate prezintă un punct mijlociu termal de reasociere mai variabil. Rata de reasociere este mai mică decît a ADN satelit, dar mai mare decît a ADN nerepetitiv. El formează hibrizi moleculari cu ARN, ceea ce înseamnă că este transcris.

Cîteva exemple de organizare genomică la eucariote ne dau imaginea marii sale diversificări. Astfel, la *Drosophila*, secvențe interme-

Scanned with OKEN Scanner

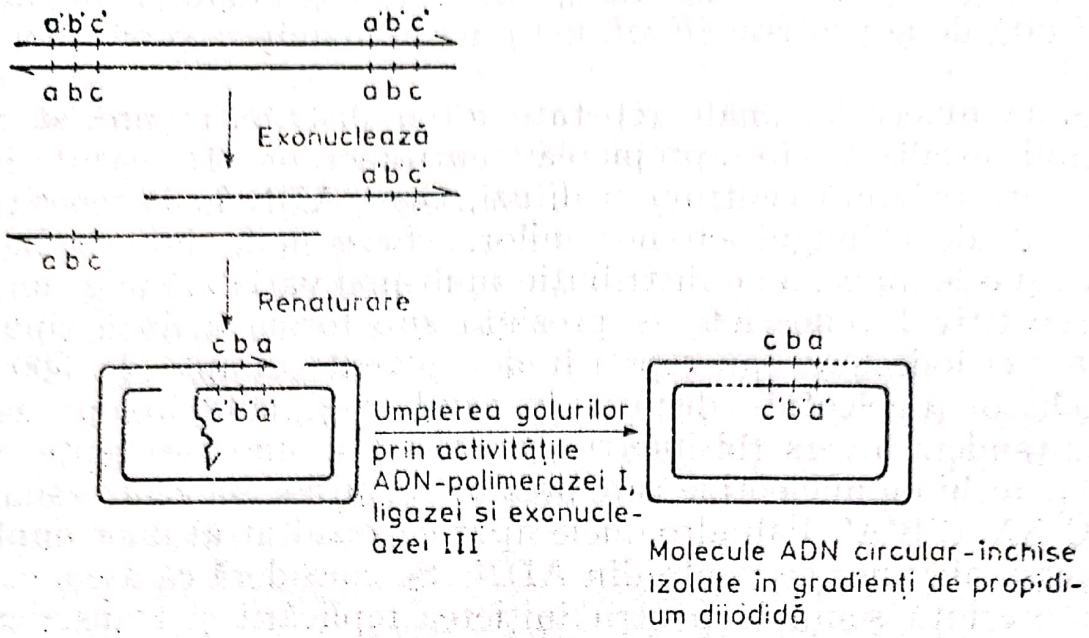


Fig. 41. **Formarea ADN circular de tip Thomas** (după Schachat și Hognes, 1974).

diar repetate, lungi de 5000—6000 perechi de baze, sînt intersperse cu secvențe unice de aproximativ aceeași lungime (Gall și colab., 1971).

La *Xenopus*, circa jumătate din genom reprezintă ADN cu secvențe intermediar repetate, lungi de circa 300 perechi de baze intercalate cu secvențe unice de peste 1000 perechi de baze. Modelul de organizare tip *Xenopus* se întîlnește la majoritatea speciilor animale. La două specii de arici-de-mare, *Strongylocentrotus purpuratus* și *S. franciscanus*, foarte înrudite, separate de 10—20 milioane de ani, apar diferențe foarte mari în frecvența de repetiție a secvențelor scurte, intersperse (Britten și colab., 1978). Unitatea de repetiție (unitatea de transcriere plus ADN spațiator adiacent) este mult mai mare la drosofilă decît la alte eucariote. La *Gallus domesticus*, prin hibridare *in situ* cu ^3H—ARN complementar la diferite fracțiuni de ADN repetitiv s-a evidențiat o fracțiune de ADN repetitiv, reprezentînd 17% din genom. El se află localizat în microcromozomi și heterozomi W (Stefos și Arrighi, 1974).

Genomul de grîu cuprinde circa 80% secvențe repetate. Cinetica renaturării a permis evidențierea a trei clase de secvență: secvențe repetate de tip palindromic ce reasociază foarte rapid (Cot = 0,02) reprezentînd 4—10% din genom; secvențe intermediar repetate (70—80% din genom) cu repetiții între 100 și 100 000. A treia fracțiune cuprinde secvențe foarte puțin repetate (de 6 ori) sau nerepetate, prezentînd viteză redusă de reasociere. Unitățile de repetiție ale diferitelor specii prezintă o considerabilă omologie de secvență, pe cînd secvențele spațiatoare diferă chiar la specii înrudite. ADN repetitiv în anumite etape din ciclul de viață este dispensabil la numeroase organisme. De exemplu, la *Stylonychia* are loc o eliminare masivă

Scanned with OKEN Scanner

de ADN, aceasta păstrînd doar 10% din totalul ADN, reprezentînd partea cu secvenţe unice, nerepetate. La insectele galicole Cecidomyide, unele Diptere, ca şi la *Cyclops*, *Ascaris* este eliminată heterocromatina reprezentată, cel puţin în parte, de ADN repetitiv.

O particularitate generală a genomului eucariot este prezenţa unor secvenţe polipirimidinice care au prezentat un înalt conservatism evolutiv şi care au determinat un dezechilibru purino/pirimidinic cu apariţia unei asimetrii în catenele complementare ale macromoleculei ADN.

c) *Gene repetate*. Cel mai cunoscut exemplu de gene repetate (prezente în mai multe copii în genom) este cel al genelor ribozomale (pentru ARNr) şi cel al genelor pentru ARNt, gene care sînt transcrise, dar nu sînt traduse în proteine.

La procariote *(Bacillus subtilis)* există cinci copii ale genelor ARNr pe cromozom, fiind singurul caz de repetitivitate genică la acest grup de organisme. Repetitivitatea genelor ribozomale este însă mult mai mare la eucariote: 400 la *Chlamydomonas reinhardi*, 13 000—23 000 la *Acetabularia mediterranea* — caz tipic de amplificare genică ribozomală, 140 la *Saccharomyces cerevisiae*, 2 500—26 000 la gimnosperme, 2 200—9 500 la dicotiledonate, 5 700—32 000 la monocotiledonate 200 la *Drosophila hydei*, 240 la *D. melanogaster*, 1150 în celulele somatice de *X. laevis* şi 2 000 000 în ovocite, 440 la om. Genele ribozomale sînt exemple tipice de secvenţe reiterate.

Genele care specifică proteine (gene transcrise şi traduse) sînt reprezentate prin secvenţe unice în genom, cu excepţia genelor pentru histone, pentru fibroina firului de mătase şi pentru proteinele secretoare sintetizate prin traducerea transcriptului ARN 75 S al inelului Balbiani BR_2 la *Chironomus*, care sînt reprezentate prin cîteva sute de copii pe genom. Amplificarea genelor pentru histone este legată de necesitatea unei sinteze rapide de histonă în timpul scurtei faze S de sinteză a ADN în vederea asamblării fibrelor nucleohistonice din cromozomii fii.

Repetitivitatea genelor ribozomale se realizează prin fenomenul de magnificare care produce copii suplimentare de ADNr în timpul spermiogenezei la mutantul „bobbed" de *D. melanogaster* ce are un număr redus de gene ribozomale comparativ cu tipul normal. Prin magnificare ADNr se realizează la descendenţi un fenotip normal, dezvoltarea normală a organismului fiind condiţionată de un anumit număr minim de unităţi ribozomale de traducere.

Fenomenul amplificării ADNr are loc în ovogeneza amfibienilor cînd, în timpul profazei meiotice, sînt replicate şi transcrise extracopiile de ADNr după care, chiar în timpul meiozei acestea sînt eliminate în nucleu şi chiar în citoplasmă.

Regiunea organizator-nucleolară (NO) a cromozomului eucariot, de regulă localizată la nivelul constricţiei secundare, deţine secvenţele

Scanned with OKEN Scanner

de ADNr, ea fiind activă în sinteza ARNr. La insecte, precum *Tipula*, *Acheta*, *Dytiscus*, amplificarea genelor ribozomale poate fi remarcată și la microscopul optic. Procesul începe cu apariția de corpuri Feulgen pozitive în vecinătatea nucleolului ovocitei care apoi se acumulează sub forma unei mase de fibre nucleohistonice ce iese din regiunea NO spre a forma așa-numitul corp ADN. La ovocitele amfibienilor, secvențele de ADNr, de diferite lungimi, separate din regiunea NO în pachiten, dau naștere la peste 1000 de micronucleoli extracromozomali distribuiți la periferia nucleului. La început acest ADNr continuă să se replice la nivelul extranucleolilor mult timp după ce replicarea ADN în cromozomi a încetat, după care devine activă în transcrierea ARNr. Uneori micronucleolii ies în citoplasmă (Ris și Kubai, 1970). La nivelul extranucleolilor se află molecule circulare de ADN asociate cu ribonucleoproteine. ADNr extranucleolar spre deosebire de ADNr din regiunea NO, nu are 5-metilcitozina. Prin replicare repetată la nivelul corpilor ADN, cantitatea de ADN extranucleolar depășește cu mult cantitatea de ADN din cromozomi (Hourcade și colab., 1974). Extranucleolii rezultă prin dispersarea corpului ADN. În axele celor 1400—1600 extranucleoli sînt pînă la 5200 molecule circulare de ADN ce apar ca niște inele moniliforme. În extranucleoli a fost detectat chiar și ADN monocatenar (Amalric și colab., 1973). Studiul electronomicroscopic al acestor axe extranucleolare a permis vizualizarea transcrierii genetice (Miller și Beaty, 1970.)

Și la eucariotele primitive apare fenomenul de amplificare a genelor. Astfel, în macronucleul ciliatului *Tetrahymena pyriformis*, genele ARNr 17 S și 25 S apar ca molecule libere, extracromozomale, dintre care 90% sînt liniare, restul fiind circulare sau lariate (circulare cu cozi), apărînd ca dimeri sau oligomeri (Gall, 1974).

După unele ipoteze, fenomenul de amplificare genică ar avea la bază un mecanism de reverstranscriere prin care, pe o matriță ARN se produc multiple copii ADN, dar mai probabilă ar fi intervenția unui mecanism de tip inel rotativ pentru care există unele dovezi electronomicroscopice prin care s-au evidențiat structuri de tipul inelelor Thomas (Thomas, 1974; Rochaix și colab., 1974; Hourcade și colab., 1974). Acesta este primul exemplu de funcționare a unui mecanism de tip inel rotativ în replicarea ADN la eucariote. Genele ribozomale, în procesul amplificării printr-o replicare în cascadă de acest tip, devin independente de complementul de ADNr cromozomal, situație care amintește de plasma germinativă a lui Weismann (Perkowska și colab., 1968). Amplificarea apare ca un caz particular de politenie, adaptat la evenimentele genetice ale meiozei (Lima-de Faria, 1974). Amplificarea a fost evidențiată și la plante, în celulele suspensorului embrionar de fasole la care se află un ADN satelit, rezultat al amplificării ADN din cromozomii politeni. Această amplificare compensează subreplicarea ADN ribozomal.

Scanned with OKEN Scanner

Genele pentru ARN 5 S sînt reprezentate în copie unică la procariote ca și la eucariote cu unele excepții *(Glyptotendipes barbipes, Xenopus)*, în care caz genele 5 S în copii multiple sînt grupate și separate de ADN spațiator într-un aranjament repetat (Pardue și colab., 1973). Genele pentru ARNt sînt, de asemenea, repetate (10—200 copii) pe genom haploid, fiind localizate în afara nucleolului ca și genele ARN 5 S (aflate la telomera brațului lung al cromozomilor). Secvențele spațiatoare din cadrul genelor ARNt sînt mult mai lungi decît cele codificatoare.

Repetitivitatea genelor pentru histone este de 200—1200 ori la diverse specii de arici-de-mare, de 50 ori la drosofilă și de 10 ori la celulele HeLa. Cele 5 gene pentru fracțiunile majore de histone sînt aranjate în tandem în ordinea H_4, H_2B, H_3, H_2A și H_1 și sînt separate de ADN spațiator de lungime mare, ele putînd fi dispuse pe un același segment de ADN (foto XIII), apărînd strîns lincate în cromozom. Regiunile spațiatoare netranscrise, bogate în AT (63%), cuprind 2/3 din ADN total pentru histone, reprezentînd elemente de control (Bradbury, 1978). Secvențele pentru histone au fost înalt conservate în cursul evoluției, fapt susținut și de hibridarea *in situ* a ARNm 9 S specific pentru histonele de arici-de-mare cu ADN de la Diptera (drosofila) și *Xenopus*. Transcrierea celor 5 gene pentru histone este polarizată (Birnstiel și colab., 1978). Genele pentru histone se află localizate în imediata vecinătate a centromerului (Grell, 1978).

Prezența de copii genice ribozomale multiple, aranjamentul în tandem al genelor ribozomale în cadrul unei singure unități de transcriere, separarea secvențelor codificatoare prin secvențe spațiatoare și clivarea produsului primar de transcriere sînt caracteristici de principiu comune procariotelor și eucariotelor.

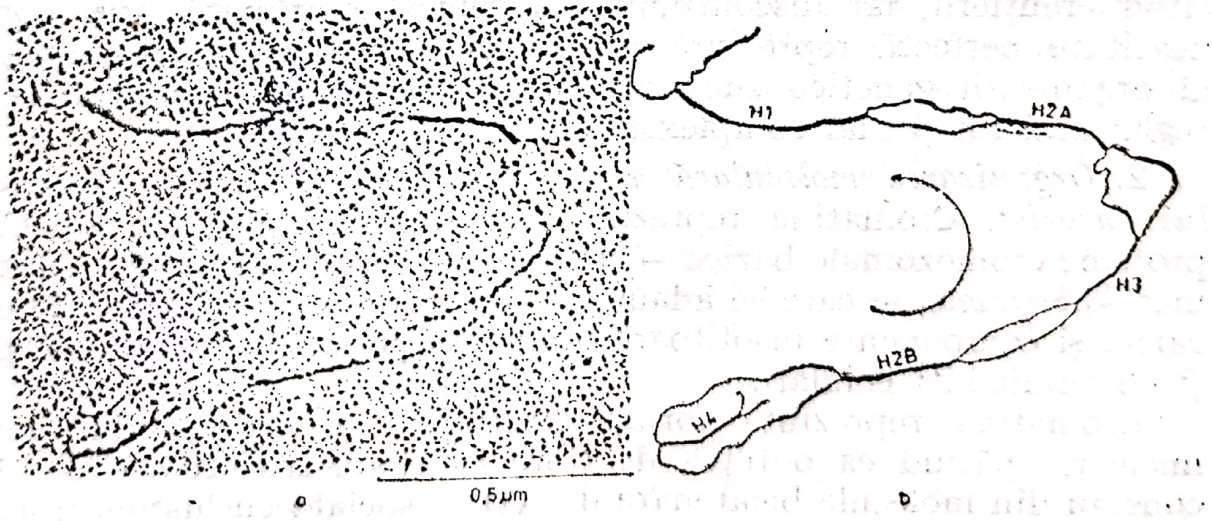


***Foto XIII* — Genele pentru histone de arici-de-mare** dispuse în tandem(a) și interpretarea electronografiei printr-un desen în care săgeata indică direcția de transcriere a acestor gene (b) (după Bradbury, 1978).

Scanned with OKEN Scanner

d) *Discontinuitate genică.* Ca și la unele virusuri (SV40, polioma), unele gene eucariote, cum ar fi cele pentru globină, ovalbumină, imunoglobulină etc., prezintă discontinuități în secvența codificatoare, tradusă în proteină. Astfel, gena ovalbuminei prezintă mai multe întreruperi în secvența codificatoare transcrisă în ARNm dintre care cel puțin una se află în cadrul ce codifică proteina (Breathnach și colab., 1977). Asemenea gene se abat de la principiul colinearității dintre secvența nucleotidelor din ADN și secvența aminoacizilor din produșii genici. Uneori chiar genele care nu sînt traduse, precum cele pentru ARNt de drojdie, și ARNr de drosofilă, prezintă secvențe ce sînt excizate în cadrul prelucrărilor posttranscripționale și deci nu mai apar în produsul matur. O situație asemănătoare se înregistrează cu mesagerii adenovirusului RSV, MLV etc. (Gilbert, 1978; Williamson, 1978). Se propune înlocuirea noțiunii de cistron cu aceea de unitate de transcriere care conține regiuni ce vor fi pierdute din produsul matur-introni (regiuni intragenice) ce alternează cu regiuni ce vor fi exprimate (extroni).

Intronii variază între 10 și 10 000 baze. Din această cauză expresia o genă — o catenă polipeptidică trebuie preluată critic. O genă — o regiune continuă de ADN corespunde în concepția actuală la o unitate de transcriere. Dar unitatea de transcriere poate corespunde la multe catene polipeptidice cu funcții înrudite sau diferite. Secvențele mijlociu repetate în cadrul intronilor pot reprezenta „pete calde" pentru recombinare spre a fi rearanjate secvențele extronice. Fenomenul intron-extron ar explica totodată organizarea genelor pentru imunoglobuline cu regiuni constante și variabile. Secvențele ADN ce codifică regiunile acestor gene sînt separate în celulele embrionare, dar apar mult mai apropiate în limfocitele diferențiate.

Rearanjamentul intragenic apare ca unul dintre mecanismele citodiferențierii, iar discontinuitatea genică exprimată prin noncolinearitate perfectă reprezintă un aspect complex, recent remarcat, al organizării genetice eucariote, legat posibil de necesitatea unui reglaj mai fin și mai complex al activității genice.

2. *Organizarea moleculară a cromatinei.* a) *Uninemia cromozomului eucariot.* Cromatina reprezintă un complex alcătuit din ADN, proteine cromozomale bazice — histone, proteine cromozomale nehistonice — hertonele, la care se adaugă o cantitate mică de ARN, ionii de calciu și componente însoțitoare lipide și lipoproteide care însă pot fi și contaminanți celulari.

Cromatina reprezintă forma interfazică a materialului genetic nuclear, apărînd ca o rețea de fibre cu diametrul 100—150 Å, ce constau din molecule bicatenare de ADN asociate cu histone formînd fibre nucleohistonice sau de cromatină. Prin superspiralizarea acestora se individualizează cromozomul eucariot (Rieger și colab., 1976), fibra de cromatină fiind echivalentă cu fibra cromozomală.

Scanned with OKEN Scanner

ADN conferă continuitate structurii cromozomului eucariot, sub acțiunea DN-azei structura cromozomală pulverizîndu-se, ceea ce nu se întîmplă sub acțiunea RN-azei sau proteinazelor.

S-a dovedit prin studii autoradiografice că proteinele cromozomale, incluzînd histonele, sînt constituenți tranzitorii ai cromozomului eucariot. Astfel, după expunerea celulelor la aminoacizi marcați ^{3}H, proteinele ambelor cromatide apar cu un marcaj radioactiv egal dar, după alte trei cicluri de diviziune, în absența aminoacizilor marcați, marcajul proteinelor cromozomale este în mod practic înlăturat. Acest comportament nu se întîlnește însă la ADN cromozomal care, deși nu este inert metabolic, prezintă o mare stabilitate metabolică, asigurînd continuitatea materială și informațională a cromozomului eucariot.

Studii de ultracentrifugare și retardație vîscoelastică (efectuate de Kavenoff și Zimm (1973) la *D. melanogaster* și de Cryer și colab. (1974) la drojdie) au demonstrat echivalența biunivocă o moleculă de ADN — un cromozom eucariot, relație aplicabilă și genomului procariot.

Cercetările lui Gall (1963), efectuate pe cromozomi plumoși (lampbrush) din ovocite izolate de *Triturus viridescens*, cercetări care au inclus și tratamente cu DN-ază, au demonstrat că buclele acestor cromozomi, pornind lateral și simetric de la nivelul unei cromomere, sînt alcătuite dintr-un singur dublu-helix ADN, pe cînd regiunile intercromomerice sînt alcătuite din două asemenea helixuri duble de ADN. Să reținem că acești cromozomi lampbrush sînt cromozomi omologi, împerecheați și aflați în stadiul de diploten al meiozei. Aceste cercetări au demonstrat uninemia cromozomului eucariot la nivel celular. La nivel molecular, uninemia cromozomului eucariot a fost dovedită de cercetările amintite ale lui Kavenoff și Zimm (1973), efectuate la Drosophila. Prin aceste cercetări s-a arătat că moleculele de ADN, izolate din cromozomii acestei diptere, reprezintă fiecare în parte ADN întreg dintr-un singur cromozom. Această concluzie are la bază observația celor doi autori după care cele mai lungi molecule de ADN au fost obținute de la acele specii de *Drosophila* care au cromozomii cei mai lungi.

Datele de mutageneză, recombinare, replicare, renaturare și ultracentrifugare a ADN eucariotic sprijină modelul uninemic al cromatidei metafazice și al cromozomului anafazic și resping modelul multinemic (Comings și Okada, 1974), cu excepția cazurilor de politenie.

Unica moleculă de ADN a cromozomului eucariot este compactată în fibra cromozomală într-un raport de împachetare de circa 7 la 1, apărînd astfel superspiralizarea prin care o moleculă lungă de ADN este condensată într-o fibră cromozomală scurtă și groasă. Cel mai înalt grad de compactare (50 la 1) se întîlnește la nivelul

Scanned with OKEN Scanner

zonelor heterocromatice, acestea fiind și heteropicnotice. Fibrele cromozomale sînt atașate la membrana nucleară în interfază ca și capetele cromozomilor (telomere) și complexele sinaptinemale.

Cromozomul metafazic apare la microscopul electronic ca o masă încîlcită de fibre de cromatină care cu greu poate fi pusă în conformitate cu modelul de pliere al lui Du Praw (1970). Macromolecula ADN a cromatidei uninemice parcurge întreaga lungime a cromozomului, prezentînd un aranjament ierarhic de spirale.

b) *Proteinele cromozomale. Histonele.* ADN nativ se află sub formă acidă, fiind în consecință oarecum instabil, deoarece apar forțe de repulsie dintre grupele fosfat, încărcate negativ, ceea ce poate duce la extensia moleculei și eventual la separarea catenelor sale. La bacterii, încărcăturile negative sînt neutralizate de formarea unor complexe ADN-ioni bivalenți (Ca^{++} și Mg^{++}) sau ADN-poliamine (putrescina și spermidina). La eucariote stabilitatea dublei-elice ADN este conferită în esență de proteinele bazice histone cu care este permanent asociată și mai puțin de ionii bivalenți. Histonele au încărcătură pozitivă datorită conținutului lor ridicat (pînă la 25%) în aminoacizi bazici, precum arginina, lizina și histidina, acești aminoacizi prezentînd un al doilea grup amino ($—NH_2$) în catena laterală a moleculei lor. Asocierea ADN cromozomal cu histonele cromozomale se realizează prin formarea de punți ionice (electrostatice) între grupele fosfat ale catenei polinucleotidice și grupele amino ale catenelor laterale ale aminoacizilor bazici din catena polipeptidică a histonelor. Histonele împreună cu ADN constituie 2/3 din greutatea cromozomului eucariot, restul fiind reprezentat de proteine nonhistone și ARN.

În cromatina eucariotelor ADN este permanent complexat cu histonele. Cromatina ciupercilor nu conține histone de tipul celor caracteristice celorlalte eucariote.

În spermatozoizi, neimplicați în sinteză de ARN și proteine, histonele sînt înlocuite de protamine. Protaminele au o secvență mult mai variabilă comparativ cu histonele și nu se sintetizează sincron cu ADN, din care cauză se consideră că genele pentru protamine și histone nu au derivat dintr-o genă ancestrală comună. Eritrocitele nucleate de păsări conțin o singură fracțiune histonică 5, desemnată prin F2C, implicată în represia finală a ADN din eritrocitele aviare mature, o alternativă la eliminarea nucleului din eritrocitele mamiferelor.

Necesitatea strictă și permanentă a complexării ADN cu histonele este rezolvată în cazul ADN nou sintetizat prin sinteza sincronă a acestor proteine și a ADN în faza S a ciclului celular. Asocierea ADN-histone se realizează prin legături electrostatice sau ionice. Caracteristic pentru eucariote este raportul cantitativ unitar ADN-histone, practic același în toate țesuturile aceluiași organism (atît în regiunile active în transcriere ale genomului — regiuni cu cromatină difuză,

Scanned with OKEN Scanner

cît și în regiunile cu cromatina condensată, inactive în transcriere), ca și la specii diferite.

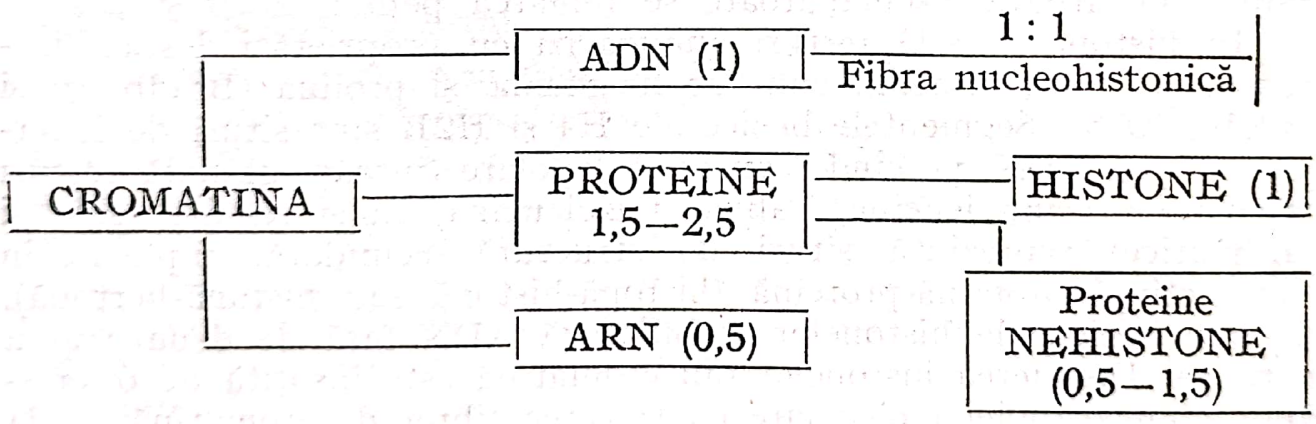
Simpozionul CIBA Foundation din anul 1974 a propus clasificarea histonelor în trei grupe majore (histone bogate în lizină, histone bogate în arginină și histone cu conținut mediu de lizină) și două grupe minore (tabelul 10, v. sfîrșitul lucrării).

Cu excepția histonei H1, care prezintă pe lîngă o oarecare variație cantitativă și o mai mare variabilitate de secvență, toate celelalte fracțiuni de histonă se află în cantități aproape echimolare în structura cromatinei. Histonele nu au specifitate de țesut. Excepție face histona F2C din eritrocitele nucleate de păsări care, ca și protaminele asociate cromatinei spermatozoizilor, prezintă specificitate pentru țesuturi cu celule ale unor linii celulare terminale.

Din compoziția chimică a histonelor lipsesc fenilalanina, tirozina și triptofanul (Stein și colab., 1975). Recent a fost descrisă o proteină bazică A24 care este formată dintr-o moleculă H2A la care, la restul lizină din poziția 119, este legată o altă proteină, ubiquitina.

În evoluția eucariotelor a avut loc o remarcabilă conservare a secvenței histonelor bogate în arginină (H3 și H4), din care cauză se consideră că ele interacționează cu regiuni specifice și esențiale din ADN. Histonele bogate în lizină se pare că interacționează cu regiuni mai variabile ale ADN.

Cea mai mică histonă, H4 (GM = 11 300), extrasă din timus de vițel și din cotiledoane de mazăre, a fost complet secvențiată (De Lange și colab., 1969). În secvența sa de 102 aminoacizi 14 sînt resturi arginină și 11 sînt resturi lizină.



Componentele majore ale cromatinei
(în paranteză raporturile cantitative)
(modificat după Stein și colab., 1975).

Diferența de secvență (rata de mutație punctiformă) la H4 a celor două surse este de numai 2%, la 100 milioane de ani, fiind vorba de două modificări conservatoare în care izoleucina înlocuiește valina în poziția 60, iar arginina înlocuiește lizina în poziția 77.

Scanned with OKEN Scanner

Nici o altă proteină studiată pînă acum nu prezintă o rată de mutație atît de mică (citocromul are o rată de mutație de 3%, iar hemoglobina de 14%) și o structură atît de unitară la două organisme foarte diferite, ceea ce sugerează că fiecare rest aminoacid din secvența polipeptidică a H4 este esențial pentru funcția histonei, pentru supraviețuirea organismelor și că funcția ei este identică la toate eucariotele, fiind legată de un aspect esențial al structurii cromozomului eucariot.

Regiunea terminală NH_2 a catenei polipeptidice H4 (resturile 1—45) cuprinde cele mai multe resturi aminoacizi bazici, căpătînd astfel un caracter bazic foarte pregnant, pe cînd regiunea terminală —COOH (resturile 46—102) reprezintă segmentul hidrofob și este numai ușor bazică. Se consideră că regiunea terminală N este implicată în legarea la ADN, pe cînd regiunea terminală C este în măsură să realizeze legături interhistonice sau să interacționeze cu alte componente ale cromatinei. Histona H3, bogată în arginină, este singura care conține cisteină, ceea ce sugerează funcții speciale pentru ea, deoarece se pot forma punți bisulfidice. Și această histonă manifestă conservatorism de secvență. Celelalte trei histone, bogate în lizină, nu manifestă conservatorism de secvență. Ordinea descrescîndă a conservatorismului de secvență este H4, H3, H2A, H2B, H1 (De Lange și Smith, 1974). Cea mai mare histonă este H1. Ea are 216 resturi aminoacizi. Prezintă, de asemenea, cea mai mare variabilitate de secvență, fiind implicată în interacțiunile cu componentele mai variabile ale cromatinei (hertone, regiuni variabile ale altor histone etc.).

Pe baza unor asemănări în secvența H2A, H3 și H4 s-a sugerat derivarea genelor pentru aceste histone dintr-o genă ancestrală comună. O situație asemănătoare se remarcă pentru H2B și H1.

În histone se află resturi aminoacizi cu proprietăți destabilizatoare ale dublului-helix, cum ar fi glicina și prolina (Bradbury și colab., 1975). Segmentele bazice ale H4 și H2B sînt situri de interacțiune cu ADN, pe cînd segmentele apolare (în care abundă resturi apolare, precum leucina, valina și izoleucina, ca și resturi acide și aromatice) reprezintă situri de structură secundară, implicate în interacțiuni proteină-proteină (histonă-histonă sau histonă-hertonă). Părțile bazice ale histonelor stabilizează ADN față de denaturarea termică. Disocierea histonelor din cromatină este însoțită de o creștere a anizotropiei moleculare cu trecerea fibrei de cromatină de la o formă compactă la o formă extinsă ce manifestă proprietățile dublului-helix liber, necomplexat cu histone.

Legăturile ionice dintre grupele fosfat ale catenelor ADN, care au încărcătură negativă, și grupele NH_2 ale histonelor, care acționează ca policationi (cu încărcătură pozitivă), condiționează stabilitatea structurală a nucleoproteinelor cromatinei. Histonele nu au specificitate de secvență, dar intensitatea legării la ADN a diferitelor fracțiuni histonice este diferențiată. Astfel, resturile lizină se leagă

Scanned with OKEN Scanner

preferențial la perechile A—T, pe cînd resturile arginină se leagă preferențial la perechile G—C (Clark și Felsenfeld, 1974; Felsenfeld și colab., 1975). Legarea histonelor la ADN se realizează la nivelul concavității mari, scobitura mică rămînînd liberă, reprezentînd suprafața de lucru a ADN în cadrul cromatinei, ARN-polimeraza recunoscînd secvențe specifice tocmai la nivelul acesteia. Rolul histonelor este legat de menținerea și controlul conformației cromozomilor (spiralizarea și condensarea cromatinei). În urma complexării ADN cu histonele, cromatina capătă structură condensată, superspiralizată, stare în care ADN nu este disponibil pentru transcriere, fiind inaccesibil ca matriță pentru ARN-polimerază. Din această cauză, histonele apar ca represori genici generali, deci nespecifici.

Structura fibrei nucleohistonice este determinată în parte și de interacțiunile dintre fracțiunile histonice. Histonele bogate în lizină, cele mai variabile ca structură, manifestă o oarecare specificitate de țesut și specie, nefiind implicate în formarea structurii pliate de bază a cromatinei.

Condensarea cromozomală ce are loc înaintea diviziunii nucleare este precedată de o fosforilare extensivă a histonei H1, sub acțiunea fosfokinazei histonice sau fosfatazei histonice, avînd efect marcant asupra interacțiunii cu ADN. Adăugată în cultura sincronizată de *Physarum polycephalum*, fosfokinaza histonică declanșează mitoza cu 40 de minute înainte față de cultura de control, fosforilarea histonei bogată în lizină fiind deci implicată în condensarea cromozomală. Pe această bază, Bradbury și colab. (1975) au admis că mecanismul mitotic la eucariote este, cel puțin în parte, controlat prin fosforilarea histonelor bogate în lizină.

Atașarea histonelor nou sintetizate la ADN este facilitată în special de acetilarea lor. Asemenea modificări chimice și mai ales metilarea și fosforilarea se leagă de spiralizarea (condensarea) cromonemelor, menținerea conformației corecte a nucleohistonelor, activitatea de transcriere, diferențierea celulară etc. (Dixon și colab., 1975).

În prezent este greu să se atribuie un rol particular specific structural, pentru fracțiunile individuale ale histonelor, deși din experiențele de reconstituire a cromatinei rezultă că histona H1, spre deosebire de celelalte fracțiuni, nu este necesară pentru realizarea unei structuri cromatiniene normale. Fracțiunile histonice H4, H3 și H2A sînt esențiale pentru asigurarea superspiralizării fibrei nucleohistonice. Neavînd specificitate de secvență (Georgiev, 1969), a fost posibilă reconstituirea unei structuri cromatiniene tipic eucariote, folosindu-se ADN al fagilor λ și T7 sau de SV40 și histone din timus de vițel. Histonele bogate în arginină sînt, după toate probabilitățile, implicate în controlul împachetării (plierii) moleculelor lungi de ADN din cromozomul eucariot, în spiralizarea și despiralizarea fibrei de cromatină (Felsenfeld, 1978).

Scanned with OKEN Scanner

Modificările chimice reversibile în catenele laterale ale H4, de tip acetilare, fosforilare, metilare etc., comparabile cu modificările alosterice din sistemele enzimatice, duc la modificarea structurii cromatinei avînd ca efect derepresia genică.

Prin fosforilarea resturilor serină din H1, este slăbită legarea acesteia la ADN, realizîndu-se derepresia unor regiuni mari din genom, în vederea transcrierii genice. Acetilarea resturilor lizină se face în regiunile NH_2 terminale ale histonelor, transformînd aceste resturi din bazice sau cu încărcături pozitive în neutre, schimbîndu-se astfel interacțiunea cu ADN, acetilarea histonelor fiind necesară în replicarea ADN și în transcrierea sa. Prin fosforilare, resturile neutre serina și treonina sînt transformate în fosfat de serină și treonină, încărcate negativ fiind astfel respinse de grupele fosfat din ADN ce au tot încărcătură negativă. Fosforilarea H1 duce la condensarea cromozomului cu 20 minute înainte de metafază, ceea ce a fost evidențiat la microscopul cu contrast de fază. Prin defosforilarea H1 are loc decondensarea cromozomului metafazic.

c) *Nucleozomii.*

Din interacțiunea ADN-histone rezultă o ierarhie a spiralizării fibrei nucleohistonice care pornește de la spirala de ADN de 25 Å diametru, la supraspirala nucleohistonică de 100 Å pînă la supraspirala încolăcită de 200 — 300 Å diametru.

Fibra de cromatină (nucleohistonică) prezintă un aranjament repetitiv, regulat de structuri globulare, demonstrat în experiențe de digestie enzimatică, ce evidențiază că atacul cu nuclează se realizează asupra unor regiuni aflate în intervale regulate de la 10 la 200 perechi de baze, între aceste situri de atac, ADN fiind protejat de histone. Aceste structuri globulare sînt dispuse liniar și au fost numite nucleozomi. Ei conferă fibrei de cromatină un aspect moniliform, de șirag de mărgele. Nucleozomii au fost numiți inițial corpi γ sau corpi nu (Olins și Olins, 1973) și reprezintă unitatea de structură a cromatinei eucariote (Kornberg, 1974; Oudet și colab., 1975; Schwarzacher, 1976; Bradbury, 1978), corespunzînd structurii terțiare, superelicoidale a ADN.

Studiile de degradare enzimatică a cromatinei au arătat că DN-aza digeră cromatina eucariotă la nivelul siturilor unde ADN nu este asociat cu histonele. Fracționarea prin centrifugare a cromatinei digerate relevă un set de componente care au viteză crescută de sedimentare și deci dimensiune crescîndă.

Cele mai mici componente constau dintr-un fragment de ADN de 200 perechi de baze lungime la care se leagă patru perechi de histone. Cele mai mari componente ale cromatinei digerate constau din multipli ai acestei unități de 200 perechi de baze ce sînt încă unite printr-o moleculă ADN continuă, neclivată. Acestea apar la microscopul electronic ca mărgelele pe ață, mărgelele (nucleozomii)

Scanned with OKEN Scanner

corespunzînd componentei de 200 perechi de baze iar ața, segmentelor de ADN neacoperite de histone. Diametrul mărgelei este de circa 100 Å în contrast cu lungimea de $200 \times 3{,}4 = 680$ Å peste care ar trebui să se întindă cele 200 perechi de baze din dubla-elice. Astfel, combinarea cu cele patru perechi de histone determină o pliere (împachetare) în raport de 7 : 1 a lungimii ADN în cromatină, sectorul de 200 perechi de baze din molecula ADN înfășurînd strîns o sferă histonică formată din două jumătăți avînd circa 100 Å diametru.

Difracția în raze X confirmă studiile electronomicroscopice referitoare la prezența unei unități repetitive (nucleozom) la fiecare 100 Å de-a lungul fibrei de cromatină. Împachetarea ADN din cromatină într-o structură moniliformă oferă posibilitatea pentru o comprimare ulterioară a ADN în organizarea structurală a cromozomului. Fibra de cromatină apare ca un șirag de mărgele care este înfășurată astfel că ocupă lungimea unui cromozom, corespunzînd la o mică fracțiune din lungimea dublului-helix ADN.

Nucleozomii apar ca structuri constante, permanente, atît în cromatina interfazică, cît și în cromozomul metafazic (Wingler și Axel, 1976). De asemenea, nucleozomii există atît în eucromatină, cît și în heterocromatină. Pe aceste baze se poate explica continuitatea structural-funcțională atît la nivel molecular, cît și la nivel celular-supramolecular al cromozomului eucariot care, de regulă, își pierde individualitatea în interfază. Electronomicroscopic, nucleozomii pot fi cel mai bine evidențiați la nivelul cromatinei foarte decondensate. Ei apar însă și în cromatina condensată (foto XIV).

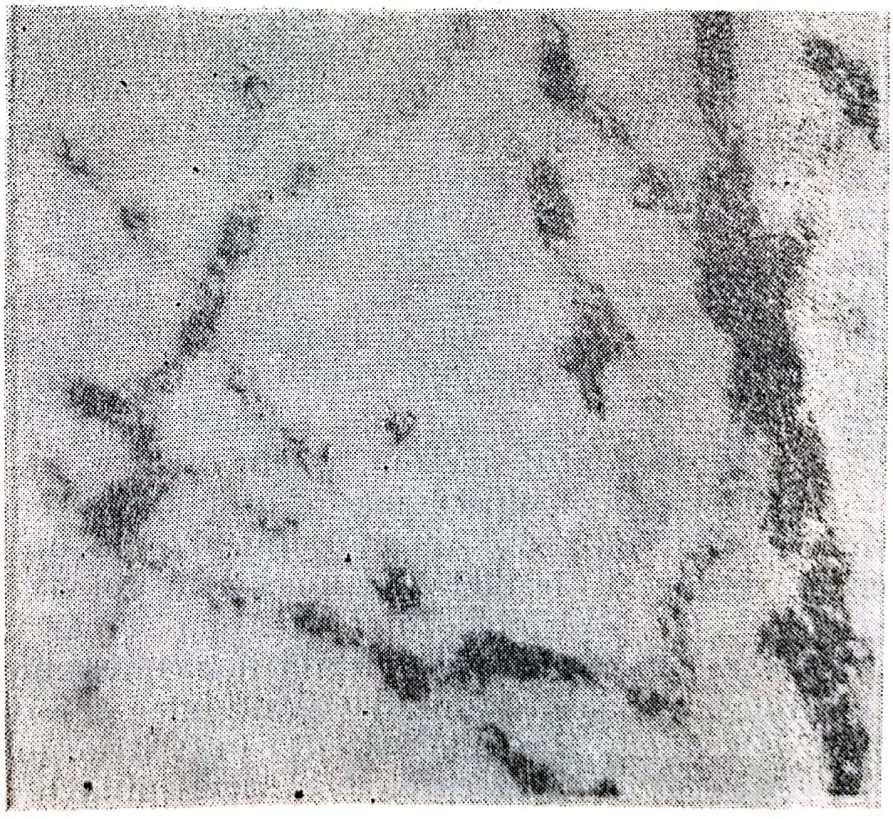


Foto XIV — **Cromatina izolată din eritrocite de găină,** prezentînd aspectul moniliform al fibrelor nucleohistonice. Fiecare fibră are un diametru de 75Å. Structurile moniliforme reprezintă nucleozomii (după C. Woodcock, din **C. P. Swanson** și **P. L. Webster,** *The Cell*, Prentice-Hall, Inc., 1977).

Scanned with OKEN Scanner

Particula nucleozomică are o constantă de sedimentare de 11 S și o densitate în CsCl neutră de 1,437 g/cm³. Diametrul nucleozomului este de 70 — 110 Å. El este alcătuit din cantități egale ale histonelor H2A, H2B, H3 și H4, care se asociază cu un segment de ADN de 160 — 200 perechi de baze. Histonele alcătuiesc la nivelul nucleozomului un octamer cu formula 2 H2A, 2 H2B, 2 H3 și 2 H4. Histona H1 este asociată nucleozomului, dar nu se știe încă modalitatea sa de participare (Finch și colab., 1977). Greutatea moleculară a octamerului histonic este de 110 000 daltoni. Între doi nucleozomi adiacenți se află ADN liber, necomplexat cu histone, lung de 1,8—3 nm. Complexul histonic al nucleozomului este înfășurat de molecula de ADN, printr-o înfășurare de tip răsucire *(kinking)* a duplexului ADN pe suprafața exterioară a miezului nucleozomic (octamerului histonic). Studiile de difracție a neutronilor *(neutron-scattering)* au plasat în mod neambiguu ADN la exteriorul octamerului histonic.

Studii electronomicroscopice și de difracție în raze X asupra cristalelor nucleozomale au dus la stabilirea că axa nucleozomală (octamerul) apare ca o particulă turtită(110 × 110 × 57 Å) de forma unei pene de lemn, sau de disc bistratificat. Pe axa histonică turtită se înfășoară dubla-elice ADN în ture de 1 și 3/4 de supraelice cu un pas de 28 Å. Dar cea mai probabilă formă a nucleozomului este de cilindru turtit de circa 100 Å diametru și 50 Å înălțime înfășurat de ADN (Felsenfeld, 1978, Bradbury, 1978). ADN asociat octomerului este de 140 perechi de baze la care se adaugă o lungime adițională de ADN, de 20 — 60 perechi de baze, asociat probabil histonei H1 (Kallenbach și colab., 1978). Axa nucleozomică turtită s-a numit platizom și are două jumătăți identice, fiecare jumătate fiind alcătuită din cele patru histone, dînd o imagine în oglindă reprezentînd o diadă. ADN de la periferia octomerului este dispus pe axa nucleozomului după un superhelix care are un pas de 28 Å și un diametru de 90 Å (fig. 42), existînd un număr de 75 — 82 de baze pe tură de superelice a ADN forma B. Prin plierea dublei-elice ADN pot fi cantonate cele 140 de perechi de baze din ADN forma B ce au circa 500 Å lungime, într-un spațiu mult mai mic pe care îl oferă axa particulei nucleozomice. Sînt puțin înțelese în prezent aspectele referitoare la împachetarea ADN în nucleozom ca și la aranjamentul histonelor în nucleozom.

În fibra nucleohistonică a cromatinei eucariotelor nucleozomii sînt dispuși după un solenoid (fig. 42) cu un pas *(pitch)* de 100 Å, cu un diametru de 300 Å și un spațiu gol de 100 Å. Fiecare tur de spiră are 6 — 10 nucleozomi. Histona H1 ar juca un rol în această înfășurare a nucleozomilor fibrei nucleohistonice, legîndu-se de ADN internucleozomic și stabilind legături între diferitele regiuni ale cromatinei (Bradbury, 1978). Existența unei structuri diadice este dovedită de acțiunea DN-azei care, dacă determină o crestătură în molecula

Scanned with OKEN Scanner

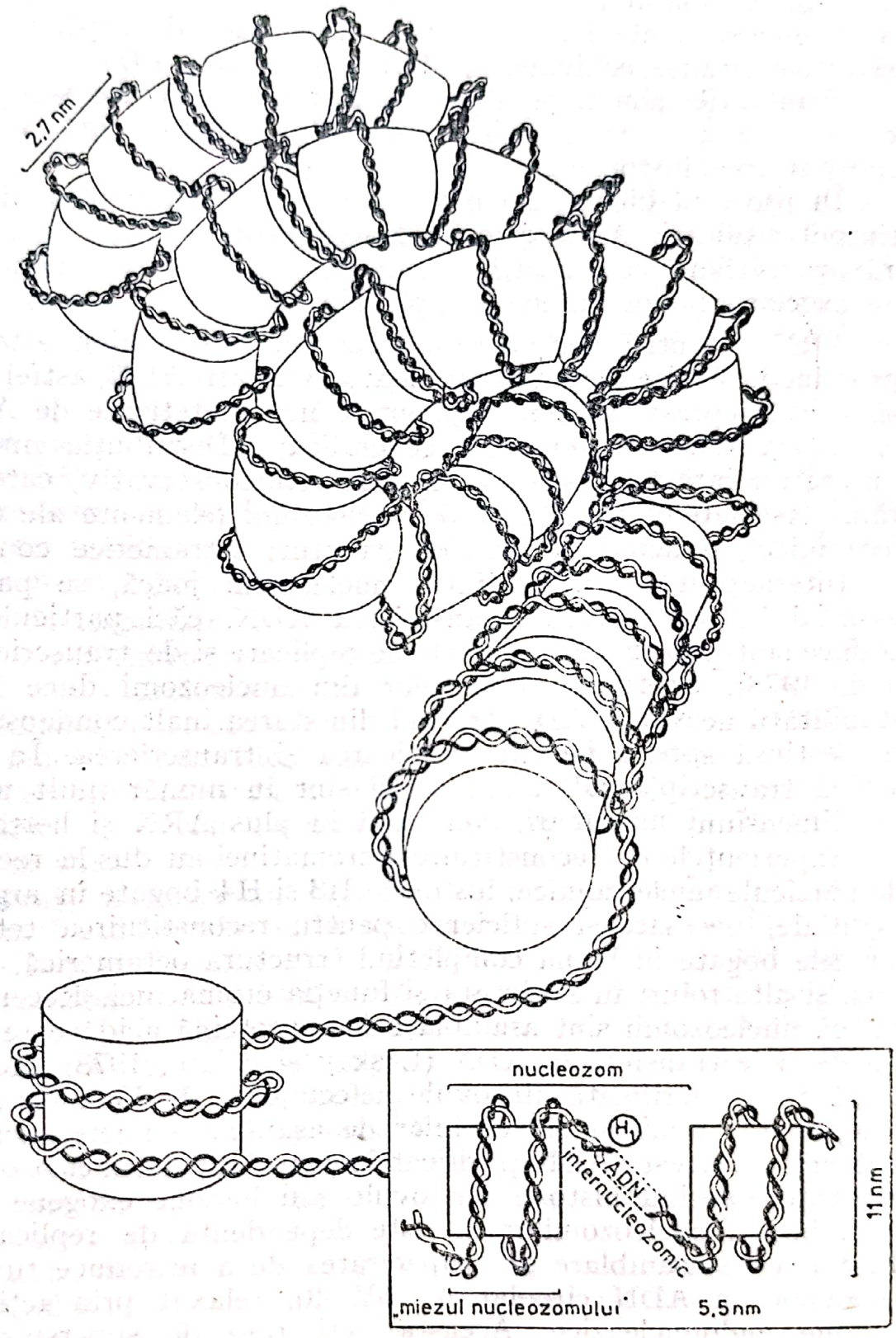


Fig. 42. Reprezentarea actuală a fibrei superspiralizate de cromatină (modelul nucleozomal) (după Bradbury, 1978).

Scanned with OKEN Scanner

de ADN pe o jumătate a axei nucleozomale cu aceeași probabilitate determină o crestătură și în ADN de pe cealaltă jumătate a axei nucleozomale la o distanță egală față de capătul 5′ al ADN și într-o poziție echivalentă (Finch și colab., 1977).

Jumătățile simetrice ale particulei nucleozomice s-ar putea deschide spre a permite citirea mesajului genetic, fără a fi necesară îndepărtarea histonelor.

În procesul biosintezei cromatinei, comportamentul histonelor în timpul replicării ADN este de tip semiconservativ : histonele vechi rămîn asociate cu catenele vechi de ADN iar cele nou sintetizate se asociază noilor catene complementare.

ARNm pentru histone se asociază cu ribozomii și este tradus în proteine histonice numai în momentul sintezei ADN, astfel ca acestea să poată represa imediat segmentele nou sintetizate de ADN, exercitîndu-și rolul de represori generalizați. Distribuția nucleozomilor nu are un caracter dispersiv, ci unul semiconservativ, catenele vechi rămîn asociate cu jumătățile de nucleozomi (elemente ale diadei nucleozomice), refăcîndu-și ulterior structuri tetramerice complete.

Interacțiunile din și dintre nucleozomi joacă, se pare, un rol esențial în replicarea și transcrierea ADN, căci particulele nucleozomice sînt prezente în punctele de replicare și de transcriere (Felsenfeld, 1978). Acetilarea histonelor din nucleozomi duce la slăbirea stabilității acestora, ADN trecînd din starea înalt condensată în stare destinsă spre a permite replicarea și transcrierea. În cromatina activă transcripțional, nucleozomii sînt în număr mult mai mic și au dimensiuni mai mari, conținînd în plus ARN și hertone.

Experiențele de reconstituire a cromatinei au dus la reconstituirea de particule nucleozomice, histonele H3 și H4 bogate în arginină fiind esențiale, necesare și suficiente pentru reconstituirea tetramerului, iar cele bogate în lizină completînd structura octamerică, ele putînd juca şi alte roluri în structura și funcția cromatinei. Recent s-a arătat că nucleozomii sînt asamblați de o proteină acidă care leagă histonele și le transferă la ADN (Laskey și colab., 1978). Această proteină a fost purificată din ovule nefecundate de *Xenopus laevis* prin fracționarea unui sistem acelular de asamblare nucleozomală. Acest sistem convertește ADN purificat într-un lanț de nucleozomi regulat repetați, folosind histone din ovule sau histone exogene purificate. Asamblarea nucleozomilor nu este dependentă de replicarea ADN. Proteina de asamblare are capacitatea de a introduce tururi superelicoidale în ADN circular de SV 40, relaxat prin acțiunea unor enzime endonucleazice. Această activitate de superspiralizare nu trebuie confundată cu aceea a ADN-girazei procariotelor care de asemenea introduce tururi superelicoidale în ADN, această ADN-girază necesitînd ATP, dar nu și cantități stoichilometrice de proteine structurale — histone —, așa cum cere proteina acidă de asamblare

Scanned with OKEN Scanner

a nucleozomilor. În plus activitatea ADN-girazei este contrabalansată de enzima ce crestează și închide *(nicking-closing enzyme)*.

Reconstituirea nucleozomilor din ADN separat și histone separate se realizează printr-o dializă prelungită cu 1M NaCl și 5M uree. În condiții fiziologice de concentrație ionică, amestecurile ADN cu histonele precipită.

Recent, s-a constatat că omogenate din ovule de *Xenopus* împiedică precipitarea și conduc la formarea nucleozomilor. Aceste studii au arătat că în condiții normale ovulele conțin un factor care în condiții fiziologice ordonează interacțiunea histonelor și ADN spre a forma nucleozomi. Factorul acesta este rezistent la ribonucleaza A, nuclează micrococală, la tripsină și chimotripsină, dar sensibil la proteinaze, de unde s-a tras concluzia că el este de natură proteinică.

Numărul de tururi superelicoidale introduse de această enzimă în ADN de SV40 relaxat prin acțiunea enzimei endonucleazice ce determină crestarea și închiderea la nivelul monocatenei corespunde numărului de nucleozomi de pe ADN de SV 40 care apare ca un minicromozom cu aspect caracteristic moniliform.

Proteina de asamblare are o greutate moleculară de 29 000 daltoni. Ea previne precipitarea amestecului histone-ADN, legîndu-se la histone, formînd un complex activ care acționînd asupra ADN va determina asamblarea nucleozomilor. Asemenea proteină de asamblare a nucleozomilor a fost identificată și în nucleele fibroblastelor de șoarece și în embrionii de grîu, de unde se poate trage concluzia asupra prezenței sale universale, jucînd rol în asamblarea nucleozomilor în cromatina eucariotă.

S-a sugerat existența unui paralelism între împachetarea ADN în cromozomul eucariotelor și în nucleoidul procariotelor, în ambele cazuri fiind implicată o superspirală de 200 perechi de baze. La *E. coli* și la cianobacteriile *Aphanocapsa* și *Anabaena* a fost descrisă o proteină bazică, înrudită cu histonele, avînd o greutate moleculară de 10 000 daltoni (Rouviere-Yanis, Gros, Griffith Haselkorn, citați de Finch, 1977 și Nagl, 1977), și care apare ca un dimer asociat cromozomului procariot, fiind responsabilă de plierea ADN. În evoluția organizării cromozomului eucariot au intervenit proteine bazice suplimentare care au produs o particulă regulată — nucleozomul — în care ADN este mai bine protejat.

Imaginea pe care o avem în prezent despre cromatină este încă statică, nefiind înțelese suficient schimbările conformaționale ale acesteia care implică modificări de compoziție.

d) *Proteinele nehistonice (NHP) sau hertonele*. Compoziția în aminoacizi a NHP diferă de a histonelor. Ele au pînă la 25% aminoacizi bazici și 30% aminoacizi acizi. Deoarece punctele izoelectrice ale diferitelor fracțiuni de proteine nehistonice (NHP) sînt dispuse

Scanned with OKEN Scanner

între $pH = 3$ și $pH = 10$, apare improprie denumirea de proteine acide dată, în unele lucrări, acestor proteine. Au mai fost numite și hertone.

NHP reprezintă un grup eterogen de proteine (Umanski, 1976; Johns și colab., 1975). Eterogenitatea structurală și funcțională remarcabilă a NHP este dovedită de cele 30 de fracțiuni separate electroforetic, prezentînd greutăți moleculare pe un diapazon foarte larg, între 5 000 și 180 000. Ele cuprind enzime ale metabolismului cromozomal (fosfokinaze, polimeraze, nucleaze, ligaze, metil și acetiltransferaze, proteaze, ATP-aza, nucleotidaze etc.), molecule activatoare și represoare legate de expresia genică (CAP), ca și proteine cu rol structural în diferite forme ale cromatinei, apoi glicoproteide și lipoproteide etc. Un component major al proteinelor cromozomale nehistonice este reprezentat de proteinele contractile actina și miozina, abundente în special la *Physarum polycephalum*. Actina este predominantă în proteinele nucleolare, sugerînd că nucleolul joacă un rol important în asamblarea aparatului mitotic specific eucariotelor, ea fiind cel mai intens transferată din citoplasmă în nucleu, la sfîrșitul fazei G_2 (Le Stourgeon și colab., 1975 ; Braun și colab., 1977).

Nu este exclus ca asemenea proteine să intre în însăși structura cromozomilor mai ales la acele eucariote, precum euglenoficeele, la care separarea cromozomilor în anafază este un proces autonom, realizat fără intervenția unui aparat mitotic (Gavrilă, 1978). Ca și histonele, NHP sînt sintetizate în citoplasmă și apoi transferate în nucleu, prezentînd o stabilitate metabolică mai mică decît a histonelor, caracterizîndu-se printr-o mare eterogenitate structural-funcțională. Spre deosebire de histone, NHP nu inhibă sinteza *in vitro* a ARN, fiind implicate în transcrierea specifică de țesut. NHP interacționează cu ADN, ARN și histonele, formînd punți de hidrogen spre aceste componente ale cromatinei și acționează ca policationi, concurînd cu histonele pentru încărcăturile negative ale fosfaților din ADN. În acest fel sînt slăbite interacțiunile ADN-histonă, determinînd decodensarea cromatinei și intensificarea activității de matriță a ADN.

NHP au atît specificitate de specie cît și de țesut. Specificitatea de țesut a NHP este dovedită imunochimic și de caracteristicile electroforetice care sînt diferite în cromatina aflată în diferite stadii și stări ale ciclului celular (interfază și metafază, pahiten și diploten, G_1 și G_2, înainte și după stimulare hormonală etc.). Sinteza lor are loc în toate stadiile ciclului celular, fiind însă maximă la sfîrșitul stadiului G_1.

Există, după unele date, o corelație pozitivă între rata fosforilării și acetilării NHP și rata sintezei ARN. Gradul de fosforilare este minim în G_2 și în diviziune, cînd sinteza ARN este minimă, și maxim începînd din G_1 pînă în S (Karn și colab). Prin fosfori-

Scanned with OKEN Scanner

lare, mai ales a resturilor seril din NHP, are loc modificarea punctelor izoelectrice ale acestora. Fosforilarea NHP le conferă încărcătură negativă și ar interveni în îndepărtarea de pe matrița ADN a represorilor generali — histonele. În parte, NHP pot juca un rol structural participînd la schimbările conformaționale ale cromatinei.

În cromatina din țesuturile active transcripțional se află o cantitate mai mare de NHP. Eucromatina este mai bogată în NHP decît heterocromatina. În cromatina condensată cantitatea de NHP este practic neglijabilă. O cantitate mică de NHP se află și în cromozomii mitotici și meiotici. Aceasta arată că, spre deosebire de histone, NHP nu participă la represia generalizată a genomului eucariot (Setin și colab., 1974).

NHP se află într-un continuu flux dinamic, caracterizîndu-se prin eterogenitate structurală, funcțională și cantitativă. Experiențele de reconstituire a cromatinei indică faptul că proprietățile dezoxiribonucleoproteinelor formate depind nu atît de ADN și histone, cît de tipul de țesut și chiar de faza din ciclul celular din care au fost extrase NHP. Astfel, cînd se folosesc ADN din măduva osoasă, histone din măduva osoasă și NHP din timus de vițel se reconstituie o cromatină a cărei transcriere duce la formarea de ARN specific de timus de vițel. Cînd se folosesc ADN și histone din timus și NHP din măduva osoasă se sintetizează un ARN specific celui din măduva osoasă. Acestea sînt dovezi peremptorii ale rolului NHP în determinarea funcționării genelor din diversele țesuturi sau în diversele stări funcționale ale celulei.

In vivo partea de proteine reglatoare din NHP se leagă de ADN în mod natural denaturat în vederea transcrierii sau replicării din faza S cînd are loc o reprogramare a activității genice în vederea diferențierii celulare și cînd sînt destrămate și structurile superspiralizate, nefuncționale ale cromatinei. NHP sintetizate intens în G_1 și începutul fazei S sînt incluse în structura cromatinei, creîndu-se o legătură între replicarea secvențială a segmentelor genomului și activarea lor ulterioară. Dacă cantitatea de NHP nu este mare sau dacă ele se disociază rapid, în celulele fiice vor putea fi active doar genele alele care s-au replicat mai devreme în faza S. Pe această cale s-ar putea realiza și inactivarea unuia dintre cromozomii X de la femela mamiferelor, care are replicare întîrziată. Legîndu-se la secvențe specifice din ADN, NHP ca și ARN cromozomal, împiedică depozitarea histonelor la acest nivel, controlînd astfel expresia genică (Holmes și colab., 1972). Însăși transcrierea genelor pentru histone este stimulată de NHP și se realizează simultan cu replicarea ADN în faza S (Jansing și colab., 1977). Studiul NHP prin folosirea anticorpilor fluorescenți specifici unei anumite fracțiuni NHP se profilează de pe acum ca un instrument de mare progres în studiul distribuției funcționale a NHP.

Scanned with OKEN Scanner

3. *Cromozomul eucariot.* Reprezintă cea mai mare subunitate a cromatinei nucleare, avînd ca element esențial de structură fibra nucleohistonică, superspiralizată. Cele mai mici unități structurale specifice cromozomului eucariot, vizibile la microscopul optic, sînt cromomerele; la nivelul lor fibra de cromatină este puternic compactată (ADN globular), fiind separate de segmente în care fibra este dreaptă (ADN fibrilar). În timpul organizării cromomerelor, genele eucariote realizează rearanjări sterice (Lima-de-Faria, 1975). Spre deosebire de cromozomul procariot care are o secvență fixă de nucleotide și un număr fix de operoni, cromozomul eucariot are capacitatea de a construi și dezmembra, pe fondul unei constituții genetice permanente, unități operative potrivit cerințelor micromediului celular existente în diferite momente ale ciclului celular. Cromomera este o configurație sterică tranzitorie, reprezentînd un caz particular de fenotip cromozomal. În structura cromozomului eucariot cromatina prezintă cele două stări reversibile, eucromatina și heterocromatina. Heterocromatina poate fi constitutivă sau cariotipică, fiind prezentă la ambii cromozomi omologi ai setului diploid. Ea este de tip centromeric și se evidențiază, prin bandare C (Arrighi și Hsu, 1971; Pardue și Gall, 1971), sau de tip necentromeric și se evidențiază prin bandare G sau Q. ADN înalt repetitiv și ADN satelit (foto XV) se află în heterocromatina centromerică, pe cînd în aceea necentromerică se află ADN repetitiv ușor bogat în AT și submetilat (Comings, 1974). O altă categorie de heterocromatină este cea facultativă rezultată prin inactivarea genetică a unuia dintre cei doi cromozomi X ai femelei mamiferelor în cadrul mecanismului de compensație de doză genetică. Heterocromatina manifestă efect

Foto XV — **Autoradiografia unei celule de șoarece, cu cromozomii aflați în metafază, la care s-a realizat hibridarea *in situ* cu ARN complementar (ARNc) marcat radioactiv, sintetizat *in vitro* pe matriță de ADN satelit de șoarece. Se remarcă localizarea centromerică a marcajului radioactiv, indiciu indirect al localizării ADN satelit în regiunea pericentromerică (după Pardue și Gall, 1971).**

Scanned with OKEN Scanner

de poziție cu implicații în represarea activității genice. Prin translocarea unui segment heterocromatic într-o regiune eucromatică a cromozomului, acest segment este reactivat. Totodată, o regiune eucromatică cum este cea a cromozomului uman 22 q translocată pe un segment heterocromatic al cromozomului 9 q va fi inactivată. În acest caz particular are loc inactivarea unei gene responsabile de controlul proliferării celulare, determinînd apariția leucemiei mieloide cronice. Pe această cale a pierderii de heterocromatină din genom poate fi determinată activarea unor gene.

Sînt încă controverse asupra necesității decondensării heterocromatinei în vederea replicării. Cromozomul eucariot (foto XVI) prezintă o anumită arhitectură moleculară dependentă de micromediul celular și o ierarhie a centrilor săi de activitate, în vîrful căreia se instalează centromerul, urmat de telomere (conțin secvențe palindro-

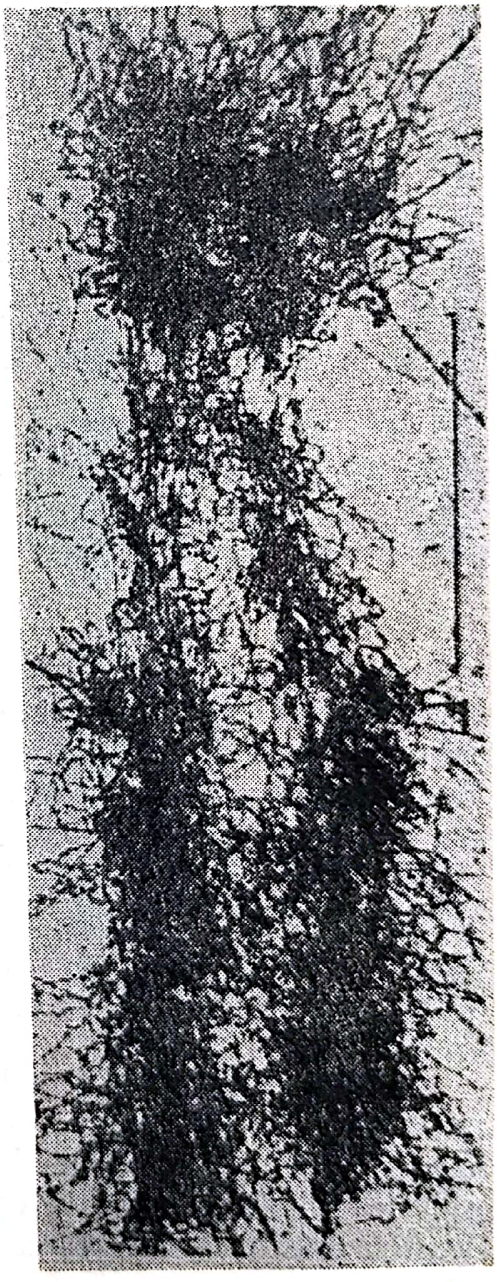


Foto XVI — **Cromozomul eucariot vizualizat la microscopul electronic** (Scala reprezintă 1 μm — (după Schwarzacher, 1976).

Scanned with OKEN Scanner

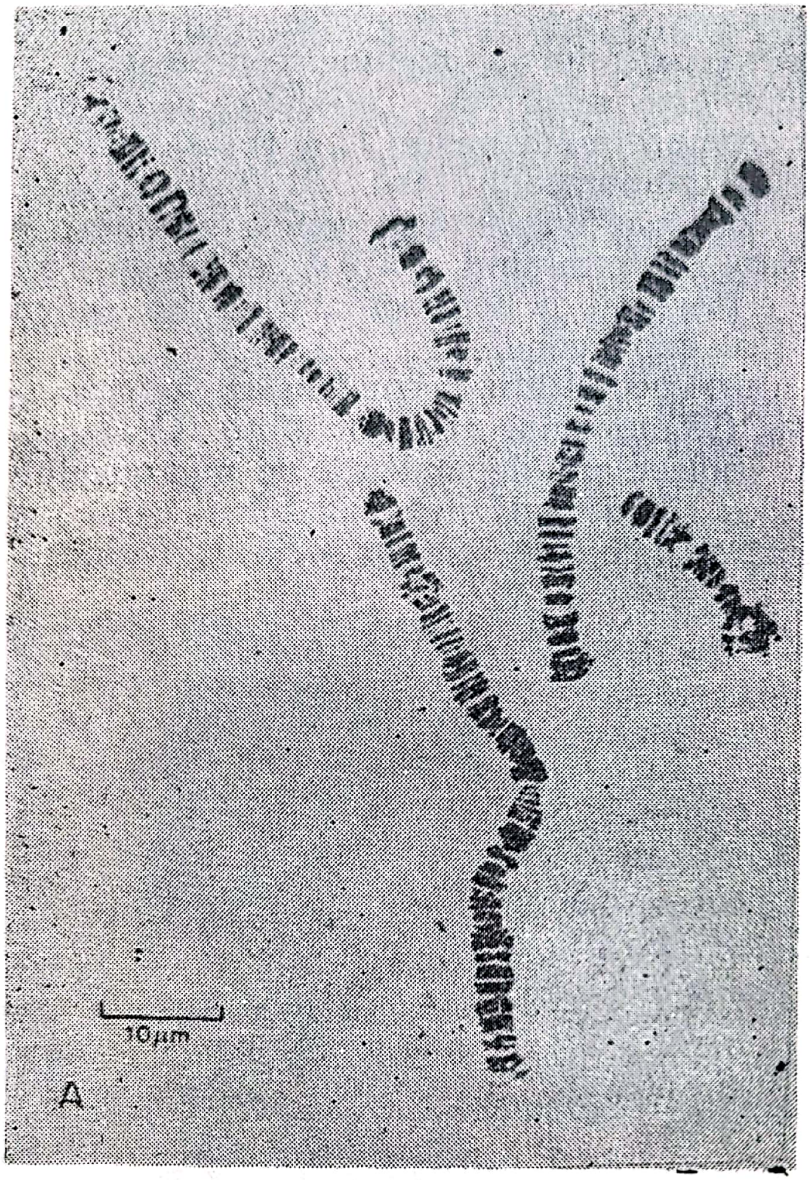
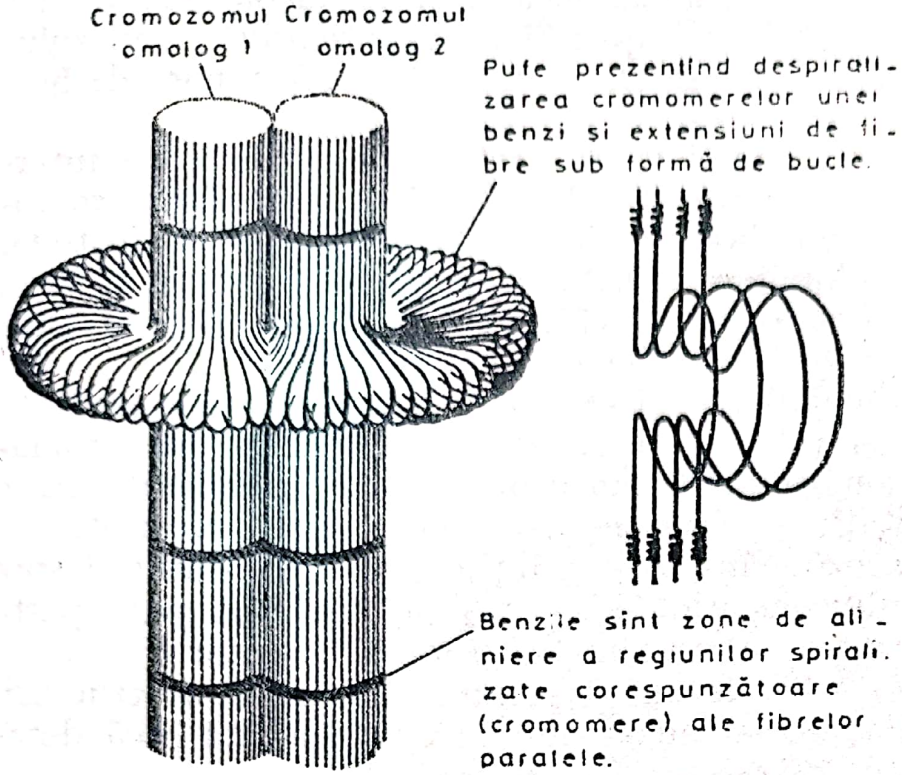


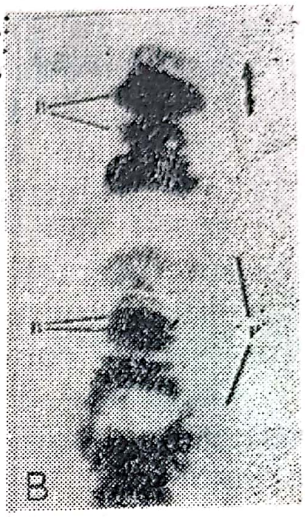
Foto XVII — **Cromozomi politenici de Chironomidae.** A — cromozomi politenici de *Chironomus obtusidens* (după Keyl, din John și Lewis, 1972). B — Pufarea (p)cromozomilor politenici de *Chironomus* și reprezentarea schematică a unui puf (după Clever, Novikoff și după Holtzman, 1970). C — Hibridarea *in situ* a ARN al inelelor Balbiani (BR_1 și BR_2) de pe cromozomul IV de *Chironomus tentans*. ARN sintetizat la nivelul inelelor Balbiani 1 și 2 hibridează preferențial cu matrița ADN corespunzătoare acestor pufuri mari, dar nu și cu aceea corespunzătoare inelului Balbiani 3 — BR_3 (după Edström și Lambert, 1976).

mice care asigură desăvîrșirea replicării moleculelor liniare de ADN), regiunea NO și regiunile heterocromatice. Genotipul cromozomal reprezintă potențialul genetic al cromozomului deținut în ADN iar fenotipul cromozomal reprezintă arhitectura sa moleculară, configurația sa sterică condiționată de mediul celular (Lima-de-Faria, 1975, 1978). Cromomerele mitotice sau meiotice, benzile, pufele și inelele Balbiani din cromozomul politen (foto XVII), buclele laterale ale cromozomului lampbrush, configurațiile meiotice ale homologilor și homeologilor sînt elemente de fenotip cromozomal care au o caracteristică comună — tranziența sau caracterul tranzitoriu.

Prin scoaterea histonelor și majorității hertonelor din cromozomii metafazici ai celulelor HeLa, Löemmli și colaboratorii săi au ajuns la concluzia că responsabilă de organizarea cromatinei în cromozomul metafazic ar fi o rețea de proteine nehistonice, structura nucleozomică nefiind suficientă pentru înțelegerea completă a organizării

Scanned with OKEN Scanner





generale a cromatinei (Cowling, 1978). Autorii citați au constatat că în urma unui asemenea tratament, ADN cromozomal rămîne într-o structură organizată și compactă al cărei miez central prezintă

Scanned with OKEN Scanner

morfologia cromozomului metafazic intact, fiind înconjurat de un halou de ADN; tratamentul cu tripsină și chemotripsină a miezului central duce la eliberarea a 6 fracțiuni majore și 25 minore de hertone.

Forma cromozomului eucariot este astfel dependentă de interacțiunile proteinelor nehistonice (Trocheris, 1978), morfologia cromozomului metafazic nefiind dictată nici de ADN și nici de histone.

Recent, Okada și Comings (1979) au descoperit existența unei organizări de ordin superior a ADN în cromozomul eucariot care apare sub formă de rozetă și interrozetă.

Aceste date care schimbă radical reprezentările noastre prezente despre interacțiunile și rolul componentelor moleculare ale cromatinei în structura cromozomului eucariot trebuie considerate ca o ilustrare a complexității structurale a cromozomului eucariot.

Conceptul de nucleozom însă a revoluționat reprezentările despre structura cromozomului eucariot și a respins cea mai mare parte a modelelor de structură cromozomală propuse anterior.

În ciuda celor peste 80 de ani de cercetare intensă a structurii cromozomului eucariot, astăzi nu se cunosc cu siguranță încă detaliile structurale ale acestuia.

Cromozomul metafazic este metabolic liniștit, neservind ca matriță nici în transcriere, nici în replicare. El este analog moleculei liniștite de ADN a particulei fagice infecțioase în repaus, împachetată spre a trece în celula gazdă următoare.

Microscopul electronic a demonstrat continuitatea cromozomului eucariotic în interfază organizat sub forma unor fibrile nucleohistonice de 200 — 300 Å diametru.

În interfază, cromozomul EK este activ metabolic, autocatalitic și heterocatalitic, servind ca matriță în replicare și transcriere. Cromozomul interfazic este astfel analog moleculei ADN a fagului vegetativ căci și aceasta direcționează evenimentele creșterii intracelulare a fagului.

O structură tipic eucariotă este complexul sinaptinemal (CS), descris în 1965 de către Moses, apărînd în meiocitele tuturor organismelor studiate pînă în prezent; CS este o structură tripartită, avînd două elemente laterale (axiale) și un element central (foto XVIII). Regiunea centrală, mai puțin electrodensă, a CS a fost numită spațiu de împerechere, avînd o lățime constantă de 100 Å, reprezentînd distanța dintre cromozomii omologi împerecheați în pahiten. La lăcuste și ascomicete, componentele laterale prezintă o structură bandată cu o periodicitate de 100 Å. Cromatina cromozomilor omologi vine în contact cu elementele laterale ale CS, pe întreaga lor lungime.

Formarea CS este dependentă de o sinteză de ADN în leptotenul tîrziu — zigotenul timpuriu (Roth și Ito, 1967) și începe cu sinteza

Scanned with OKEN Scanner

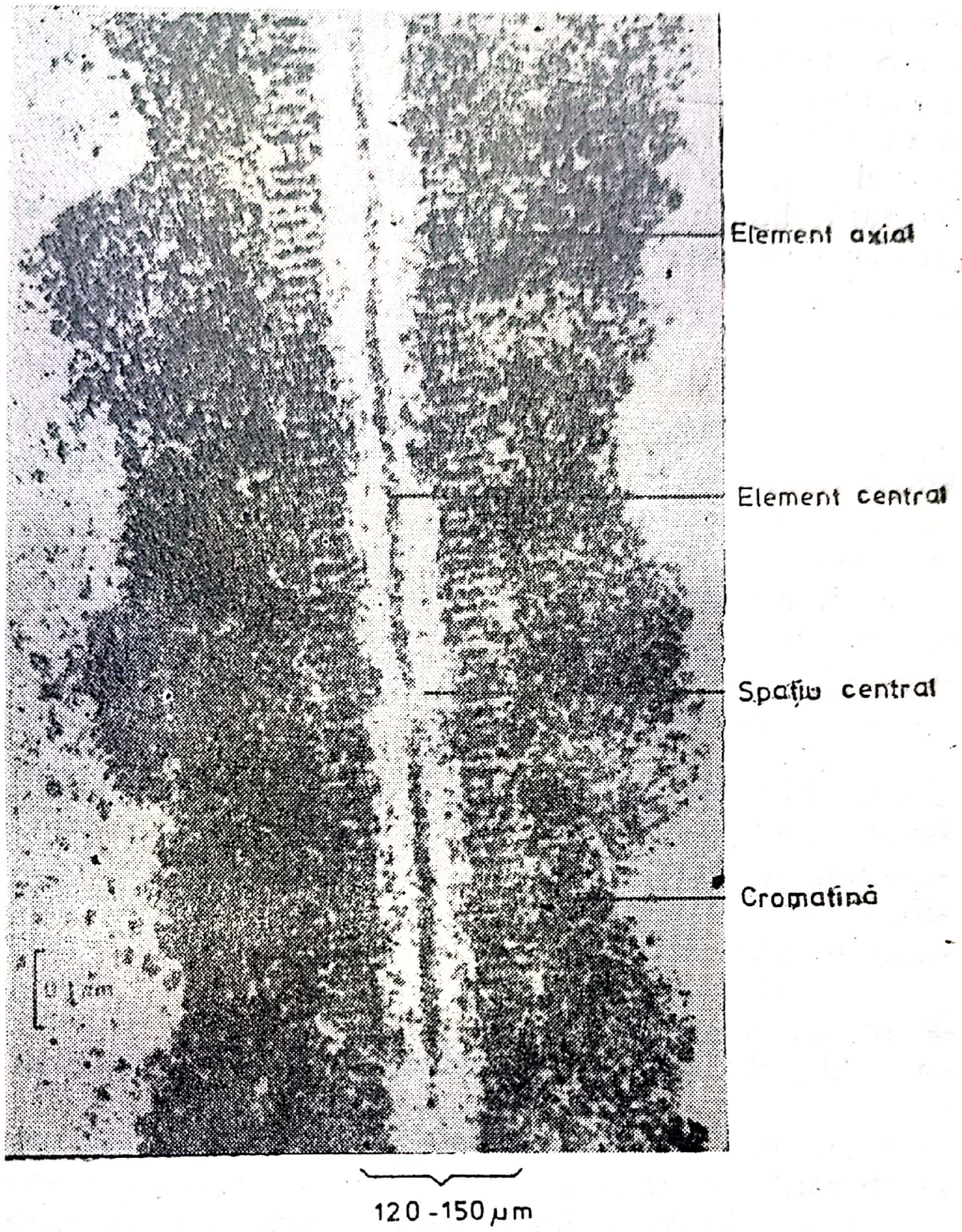


Foto XVIII — **Secțiune fină longitudinală printr-un bivalent în pahiten de la ciuperca ascomicetă** *Neotiella* în care apare complexul sinaptinemal (SC) (după Westergaard și Wettstein, 1972).

în leptoten a componentelor laterale în spațiul dintre cromatidele surori ale omologilor neîmperecheați. După o împerechere prealabilă a omologilor care se atașează prin telomere la membrana nucleară, are loc o transpoziție a elementelor laterale, apoi o asociere a lor cu asamblarea CS. Acesta determină o împerechere foarte exactă, cromomeră la cromomeră, a omologilor cu formarea bivalenților. Elementul central este derivat prin extensia unor fibrile din elementele laterale sau este sintetizat în nucleol (Westegaard și Wettstein, 1971, 1972). CS mediază schimbul reciproc de gene dintre moleculele ADN

Scanned with OKEN Scanner

ale omologilor. CS este de natură ribonucleoproteinică, proteinele fiind bazice de tip histonă. Westegaard și Wettstein (1972) consideră că elementul lateral al CS poartă informația pentru împerecherea sit la sit a cromozomilor omologi. Întîlnit și în meiocitele organismelor care nu suferă fenomenul *crossing-over*, CS reprezintă o structură necesară, dar nu și suficientă, pentru realizarea recombinării genetice prin *crossing-over* la eucariote.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul VII

ORGANIZAREA ȘI FUNCȚIONAREA GENOMULUI EXTRANUCLEAR

1. Ereditate extranucleară: substrat fizic și criterii. Atît la procariote cît și la eucariote, în afară de cromozomul principal, în primul caz, sau de genomul nuclear, în cel de-al doilea, se află structuri genetice auxiliare. Astfel, la bacterii, în citoplasmă se află una sau mai multe molecule circulare de ADN, mult mai mici decît cromozomul principal (1/100), avînd replicare autonomă. Acestea au fost numite plasmide bacteriene (cap. XIII) și sînt legate de rezistența la antibiotice, de parasexualitatea bacteriilor sau de proprietatea colicinogenică a lor.

La eucariote, în afară de genomul nuclear, există cel puțin două genoame extranucleare, unul cloroplastic, specific plantelor verzi fotosintetizatoare, și altul mitocondrial, comun plantelor și animalelor. La baza eredității extranucleare stă dublul-helix ADN care codifică macromolecule ce condiționează creșterea și specificitatea organitelor celulei eucariote implicate în fotosinteză și respirație.

Genomul mitocondrial și cloroplastic, nu însă și organitele corespunzătoare care le adăpostesc, sînt comparabile cu plasmidele bacteriene.

Sînt unele date care atestă existența unui al treilea genom extranuclear la eucariote, și anume cel al corpilor bazali ai flagelilor de la organismele protozoare flagelate, reprezentînd centriolii la aceste organisme. Astfel, după Randal și Disbrey (1965) și Granick și Gibor (1967), centriolii apar ca organite autoreproducătoare care posedă un ADN centriolar specific. Cantitatea de ADN per granul bazal este comparabilă cu aceea a fagului T_2, și anume de 208×10^{-6} pg. Mai mult, Brinkley și Stubblefield (1970) au adus dovezi despre existența de ARN în corpii bazali.

Dar există și date contradictorii referitoare la prezența ADN în corpii bazali ca și la continuitatea lor genetică.

Unele date atestă prezența de ADN liniar, bicatenar în plachetele viteline, ca și existența unor molecule 7 S—18 S de ADN asociate cu membranele citoplasmatice, incluzînd și membrana celulară a celulelor embrionare de găină, celulelor renale umane, celulelor hepatice în cultură și limfocitelor umane. Acest ADN legat de membrane

Scanned with OKEN Scanner

citoplasmatice este sintetizat în nucleu şi apare în citoplasmă : la începutul fazei S. Funcţia acestui ADN rămîne necunoscută.

Fenomenele de ereditate extranucleară au un comportament nemendelian, caracterele manifestînd o transmitere preferenţială pe linia unuia dintre genitori, de regulă pe cale citoplasmatică sau maternă. Genele citoplasmatice (citogenele) nu prezintă lincaj cu genele nucleare. Neidentitatea hibrizilor reciproci reprezintă un criteriu cert al eredităţii extranucleare.

Multe aspecte de ereditate extranucleară au însă la bază fenomene de endosimbioză. De exemplu, caracterul „killer" la parameci are ca substrat material prezenţa în citoplasma acestora a unor particule „kappa". S-a constatat că la *Paramecium tetraurelia* aceste particule „kappa" sînt reprezentate de bacteria endosimbiotică *Caedobacter taeniospiralis*, care are un cromozom principal cu $\rho = 1{,}700$ g/cm³ şi o plasmidă circulară cu $\rho = 1{,}698$ g/cm³ cu un perimetru de $13{,}75 \pm 0{,}04$ μm (Dilts, 1976). Tot astfel, particulele mu de la parameci au o natură similară. Caracterul sex-ratio de la *Drosophila* are un determinism citoplasmatic bazat pe prezenţa în citoplasma celulelor a unei spirochete din genul *Treponema*, iar sensibilitatea *D. melanogaster* la dioxid de carbon este determinată de prezenţa în citoplasma celulelor a virusului *sigma*.

Incompatibilitatea la ţînţari, care determină nefuncţionarea spermatozoizilor, este determinată de prezenţa în citoplasma ovulului a rickettsiei *Wolbachia pipientis*, moştenirea ei avînd loc pe linie maternă.

La rîndul lor, endosimbionţii pot fi gazde pentru particule virusiforme, prezenţa endosimbionţilor în citoplasma celulei gazdă fiind condiţionată de gene nucleare specifice.

La unele tulpini de drojdie s-a descris caracterul „killer" cu determinism genetic extranuclear, celulele ce posedă acest caracter secretînd o substanţă de natură proteinică care ucide celulele tulpinilor sensibile. În citoplasma celulelor „ucigaşe" s-au evidenţiat particule virale asociate cu un ARN bicatenar.

Fenomenul eredităţii extranucleare este foarte complex. El stă la baza rezistenţei la antibiotice a bacteriilor, a androsterilităţii la plantele de cultură, a rezistenţei la paraziţi vegetali, a eredităţii de tip matern a unor maladii umane precum acefalia şi spina bifida, a senescenţei la organisme vegetale (*Podospora*), animale şi om, ca şi a altor fenomene. Recent s-a demonstrat că androsterilitatea plantelor de cultură are la bază alterări în ADN mitocondrial şi nu în cel cloroplastic (Francis şi Vedel, 1977), cum se credea anterior.

Sînt unele ipoteze care implică ADN mitocondrial şi în transformarea malignă, acesta constituind un punct iniţial de integrare pentru genomul oncovirusurilor.

Scanned with OKEN Scanner

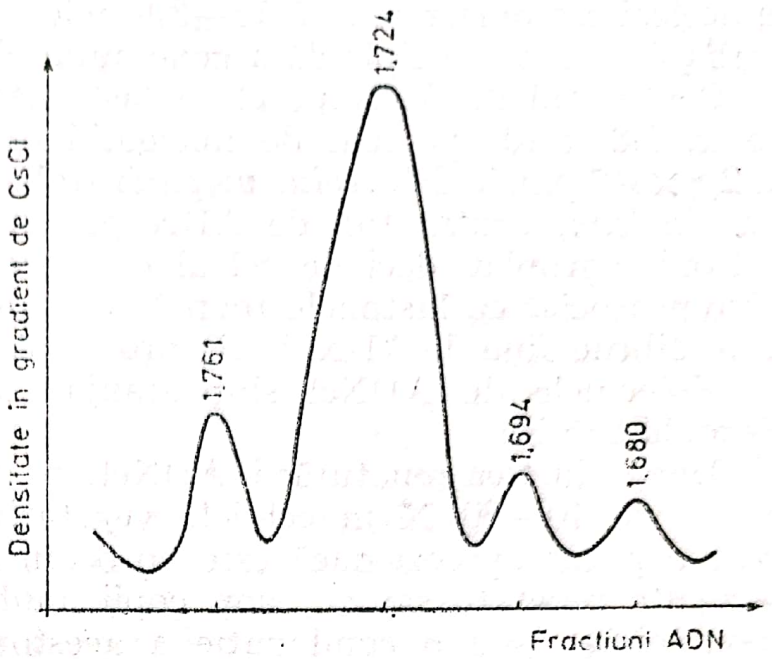


Fig. 43. **Principalele fracțiuni de ADN din celula de Chlamydomonas reinhardi** comparate cu martori moleculari (ADN al fagului SP—15 care are densitatea 1,761 g/cm³ și poli dAT de crab, cu densitatea 1,680 g/cm)³. 1,724 g/cm³ reprezintă densitatea ADN nuclear al algei, pe cînd 1,694 g/cm³ reprezintă densitatea ADN cloroplastic al acesteia (după Sager, 1972).

2. **Genomul cloroplastic.** Cloroplastul este un organit caracteristic organismelor fotosintetizante. Modul său normal de replicare (reproducere) este diviziunea binară caracteristică și celulei procariote ca și mitocondriei. Cloroplastul are ADN propriu (reprezentînd 1—10% din genomul nuclear), ARN specific, enzime și ribozomi specifici, precum și un sistem propriu de sinteză proteinică (Gibor și Granick, 1964, Borner, 1973). Densitatea de plutire (ρ) a ADNcl este uniformă atît la eucariotele inferioare (alge) — fiind de 1,694 g/cm³ la *Chlamydomonas*; 1,695 la *Chlorella*; 1,696 la *Euglena*; 1,696 la *Porphyra tenera*; 1,704 la *Acetabularia* —, cît și la eucariotele superioare (antofite) — 1,698 la *Nicotiana*; 1,696 la *Spinacea* etc.

ADNcl are o compoziție specifică de nucleotide, diferită de aceea a ADN nuclear (Manning și Richards, 1972). Astfel, la *Euglena*, ADNcl bandează la $\rho = 1{,}686$ g/cm³, pe cînd cel nuclear bandează la $\rho = 1{,}707$ g/cm³. La *Chlamydomonas* ADNcl are $\rho = 1{,}694$ g/cm³, pe cînd cel nuclear are $\rho = 1{,}724$ g/cm³, aceste două tipuri de ADN celular putîndu-se ușor separa prin ultracentrifugare izopicnică (fig. 43). ADNcl este bogat în AT, pe cînd cel nuclear este bogat în GC (Sager, 1972). ADNcl nu conține 5-metil citozină, pe cînd cel nuclear conține circa 2,5% moli de această bază (Ray și Hanawalt, 1964, 1965).

Conținutul G + C al ADNcl variază între 36 și 41%, el avînd o complexitate cinetică de 10^8 daltoni, renaturînd mult mai rapid decît ADN nuclear. De exemplu, ADNcl de *Euglena* are un conținut G + C de 31%, pe cînd cel nuclear are un conținut G + C de 48%.

De regulă, ADNcl este circular, cu un perimetru de 40—45 μm, dar poate fi și liniar incluzînd și forme circulare tranzitorii (lariate). ADNcl reprezintă de fapt cromozomul cloroplastic. În unele cazuri,

Scanned with OKEN Scanner

în același cloroplast se află 15—30 molecule ADNcl, aici fiind desigur vorba de o stare poliploidă a genomului cloroplastic.

Conținutul de ADN pe cloroplast este variabil în limite mari; de la $1{,}8 \times 10^5$ perechi de nucleotide la *Acetabularia mediterranea* la $2{,}8 \times 10^7$ p.n. la *Phaseolus vulgaris* (tabelul 11, v. sfîrșitul lucrării). La *Euglena*, conținutul de ADN pe cloroplast este de $1—4 \times 10^8$ daltoni, apropiat deci de cel al cromozomului de *E. coli*. ADNcl fiind neasociat cu histonele apare la microscopul electronic sub forma unor fibrile fine de ADN de tip procariot, cu diametrul de circa 25 Å.

Moleculele de ADNcl sînt aranjate în 5—6 regiuni ale stromei cloroplastului.

După cinetica renaturării ADNcl, se apreciază un nivel de redundanță de 10—60 X în celulele vegetative de *Chlamydomonas*, dar nu s-a putut aprecia dacă este vorba în acest caz de existența unor secvențe repetate sau a unor copii multiple ale moleculei ADNcl (poliploidie), sau o combinație a acestor două posibilități (Levine, 1972). Tot prin analiza cineticii renaturării s-a putut trage concluzia asupra existenței unei eterogenități intramoleculare a ADNcl (Stutz, 1970). Astfel, la *Chlamydomonas* și la unele plante superioare s-a evidențiat o fracțiune de ADNcl care are o rată mare de reasociere.

Capacitatea de codificare a ADNcl este suficientă pentru cîteva sute de polipeptide cu GM = 20 000 daltoni. Din totalul ADNcl, 2—3% codifică ARNr cloroplastic. Alte gene cloroplastice codifică ARNt cloroplastici, unele proteine ribozomale cloroplastice, unele proteine ale membranelor cloroplastice și ale aparatului fotosintetic. Potențialul de codificare al genomului cloroplastic este mai mare decît al celui mitocondrial.

La *Euglena*, din capacitatea de codificare a genomului cloroplastic, suficientă spre a codifica 150 polipeptide cu GM = 50 000 daltoni, doar 10% reprezintă gene structurale, restul fiind implicată în reglare.

Studii de analiză genetică a eredității extranucleare efectuate la *Chlamydomonas* au permis descoperirea fenomenelor de lincaj, mutație, segregare și recombinare a genelor cloroplastice. Primul grup de lincaj citoplasmatic, de formă circulară, avînd ca suport fizic cromozomul cloroplastic circular, a fost descris de către Sager (1972) la *Chlamydomonas*.

1. *Replicarea ADNcl.* Experiențele de transfer izotopic efectuate la *Chlamydomonas reinhardi* au demonstrat modelul semiconservativ de replicare a ADNcl (Chiang și Sueoka, 1967). ADNcl de la mazăre și porumb se replică semiconservativ, bidirecțional, atît după modelul Cairns, cît și după modelul inelului rotativ (Kolodner și Tewari, 1975). ADN nuclear și ADNcl se replică în etape diferite, dar specifice ale ciclului celular (Flechtner și Sager, 1973), ciclurile lor de replicare fiind interdependente, numai că ADNcl se replică de cîteva ori mai rapid decît ADN nuclear.

Scanned with OKEN Scanner

Replicarea ADNcl poate fi separată de aceea a ADN nuclear prin acțiunea streptomicinei, căci ea mai continuă încă un ciclu, după care celula moare. Etidium bromida distruge reversibil ADNcl nou sintetizat și degradează parțial pe cel preexistent, astfel că sub acțiunea acestei substanțe fluorocrome, replicarea ADNcl este inhibată.

În timpul gametogenezei la *Chlamydomonas*, ADNcl suferă o singură rundă de replicare. Tehnica marcării izotopice (^{15}N) și urmărirea transferului izotopic ($^{15}N \rightarrow {}^{14}N$) au permis să se stabilească că la *Chlamydomonas*, ADNcl al genitorului matern, la nivelul zigotului diploid, suferă o replicare (în timpul maturării zigotului) pe cînd ADNcl al genitorului patern nu este replicat (Sager și Lane, 1969). La 6 ore după încrucișarea mt^+ (^{15}N) x mt^- (^{14}N) se constată că în zigot se află doar ADNcl ^{15}N, deci care provine de la genitorul matern (mt^+). ADNcl de la genitorul patern (mt^-), după o sugestie a lui Sager și Ramanis (1973) este pierdut în urma degradării sale prin acțiunea unei endonucleaze de restricție produsă de celula mt^+. Pe această cale ar avea loc pierderea genomului cloroplastic patern din produșii vegetativi ce rezultă la germinarea zigotului (Sager și Lane, 1972).

S-a constatat că la *Chlamydomonas*, în primele 24 ore după formarea zigotului ADNcl, cel provenit din părintele matern, nu însă și cel provenit din părintele patern, suferă o schimbare de densitate devenind mai ușor comparativ cu cel din celulele vegetative sau din gameți. Acest fapt a fost interpretat ca reprezentînd modificarea (eventual metilarea) unor baze din macromolecula sa, făcîndu-l rezistent la sistemul enzimatic restricție-modificare care funcționează și la bacterii, ceea ce ar duce la degradarea preferențială a ADNcl patern și la transmiterea preferențială, pe linie maternă, a genelor cloroplastice. S-a admis (Sager și Ramanis, 1976) că la *Chlamydomonas* cloroplastul are doi cromozomi, fiecare posedînd un punct de atașare la membrana organitului, asemănător centromerului, care condiționează diferitele tipuri de recombinare și segregare a genelor cloroplastice.

2. *Expresia genică*. Biogeneza cloroplastelor se află sub un dublu control genetic: al genomului nuclear și al genomului cloroplastic. Dicotomia genetică caracterizează asamblarea lanțului de transport de electroni și sinteza ribozomilor cloroplastici. Cloroplastele au un sistem propriu de sinteză proteinică în care participă ribozomi cloroplastici care reprezintă 20—50% din populația de ribozomi ai celulelor fotosintetice. Cloroplastele conțin un număr mare de diferite tipuri de proteine, unele, precum enzimele din ciclul Calvin, prezente în stroma (matrixul) organitului sub formă solubilă sau semisolubilă, altele, precum componentele fotosistemelor I și II, asociate complexelor hidrofobice ale sistemelor membranare. Proteina numită „fracțiunea I", care reprezintă enzima ribulozo — 1, 5— difosfat carboxilaza, ce intervine în prima etapă a fixării (reducerii) dioxidului de carbon fiind deci esențială în fotosinteză, constituie cea mai mare parte

Scanned with OKEN Scanner

(circa 40%) din proteinele cloroplastice. Ea este o proteină majoră solubilă, a cloroplastului avînd o GM de $5,2 \times 10^5$ daltoni și compunîndu-se din două subunități: subunitatea mare ($5,5 \times 10^4$ daltoni) și subunitatea mică ($1,4 \times 10^4$ daltoni). Analiza genetică a arătat că subunitatea mică este codificată de gene nucleare, pe cînd subunitatea mare este controlată extranuclear, de gene localizate probabil în cloroplast (Hartley și colab., 1975). Gelvin și colab. (1977) au izolat subunitatea mare a ARNm pentru această proteină și au hibridizat-o cu un ADNcl constatîndu-se că are loc hibridarea acestui fragment ARNm cu un segment din ADNcl, demonstrîndu-se astfel codificarea subunității mari a acestei enzime de către o genă cloroplastică, fiind sintetizată pe ribozomi cloroplastici. Subunitatea mică a sa este codificată de o genă nucleară, fiind sintetizată pe ribozomi citoplasmatici și apoi transportată prin membrana cloroplastului în organit. În urma asocierii subunității mari cu cea mică este asamblată enzima funcțională care apare astfel, ca și ribozomii cloroplastici, un produs al cooperării genelor nucleare și genelor cloroplastice (Parthier, 1977; Chan și Wildman, 1972).

Patru componente ale lanțului fotosintetic de transport de electroni — citocromul 559 reducător al ascorbatului, citocromii 562, 563 și Q, ca și enzima din ciclul fotosintetic de reducere a carbonului, ribulozo-1, 5-difosfat-carboxilaza — necesită unele etape de traducere pe ribozomi cloroplastici. ADNcl conține informație pentru sinteza citocromilor 553 și 564, sinteză care este inhibată de către rifampicină. Cu ajutorul unei tulpini mutante, desemnată ac-206, lipsită de citocromul 553, s-a demonstrat că mutația se transmite mendelian și deci sinteza citocromului 553 este specificată și de genomul nuclear. Citocromul 552 — proteină a tilacoidelor legată de fotosinteză și fotofosforilare — este specificat de ADNcl. Proteinele membranei cloroplastului sînt specificate în cea mai mare parte de genomul nuclear. Polimerazele și enzimele asociate sînt sintetizate sub control nuclear la nivelul ribozomilor citoplasmatici de unde apoi sînt transferate în cloroplaste (Levine, 1972). A doua grupă de proteine cloroplastice cuprinde proteinele de membrane; experiențele cu cloroplaste izolate sugerează că în cloroplaste se sintetizează circa 30 de proteine discrete de acest fel (Ellis, 1975). Trei dintre acestea apar ca subunități ale factorului de cuplare cloroplastic (CF_1) care reprezintă o parte a ATP-azei cloroplastice. Celelalte proteine sintetizate în cloroplast sînt legate de cele două fotosisteme sau de citocromul f. Două sau posibil trei polipeptide ale membranei cloroplastice sînt sintetizate pe ribozomi cloroplastici. Unele dintre proteinele sintetizate de cloroplast sînt proteine ribozomale asociate sitului ce conferă eritromicino-rezistența ribozomului cloroplastului. Altele sînt asociate cu membranele cloroplastice interne și externe și acestea sînt asociate

Scanned with OKEN Scanner

cu sistemele enzimatice complexe responsabile pentru transportul de electroni dirijat la lumină.

Ribozomii cloroplastici sintetizează un număr limitat de proteine cloroplastice. Cele mai multe dintre acestea sînt sintetizate pe ribozomi citoplasmatici și apoi transportate în organit prin membrana cloroplastică.

Studiul proceselor de înverzire (transformarea unui etioplast în cloroplast funcțional) a demonstrat că în producerea unui sistem fotosintetic sînt implicate multe gene nucleare.

La orz s-au descris peste 86 de loci genici nucleari, fiecare influențînd un aspect specific al dezvoltării cloroplastului (Wettstein și colab., 1971).

Sistemul de sinteză proteinică cloroplastică este cel mai bine studiat la *Chlamydomonas reinhardi*. În cadrul acestui sistem intră ribozomi cloroplastici care, similar celor bacterieni, prezintă sensibilitate la rifampicină, spectinomicină, streptomicină, cloramfenicol și alți inhibitori ai transcrierii și traducerii. ARN-polimeraza cloroplastică, spre deosebire de cea nucleară, este sensibilă la rifampicină. Ribozomii cloroplastici se deosebesc de cei citoplasmatici, avînd o constantă de sedimentare mai mică, care, fiind de 60—68 S, îi apropie de cei de la procariote. Ei sînt mai uniformi în coeficientul de sedimentare decît cei mitocondriali, subunitățile lor sedimentînd la 28—35 S și respectiv la 33—50 S.

La *Chlamydomonas reinhardi*, ribozomii cloroplastici au constanta de sedimentare 68 S, în compoziția lor chimică intrînd ARNr 16 S și 23 S, fiind deci de tip procariot (Hoober și Blobel, 1969). În ribozomii cloroplastici s-a semnalat și prezența ARN 5 S. La *Euglena gracilis* ribozomii cloroplastici activi în sinteza proteinică au o constantă de sedimentare de 60 S, deosebindu-se marcant de cei citoplasmatici după compoziția în nucleotide a ARNr (Eisenstadt și Brawerman, 1964). Circa 20—50% din populația de ribozomi a celulelor fotosintetice sînt reprezentate de ribozomii cloroplastici a căror asamblare are loc în interiorul cloroplastelor. Din capacitatea de codificare a ADNcl, circa 6% codifică ARNr, existînd 3—6 copii genice ARNr pe genom cloroplastic, mult mai puțin comparativ cu copiile genice pentru ARNr citoplasmatic (Scott, 1973; Rawson, 1975).

ARNr cloroplastic nu hibridează cu ADN nuclear, ca dealtfel nici cu ADN al celulei crescute la întuneric și care nu a mai sintetizat ADNcl. El hibridează însă cu segmentul de ADNcl la nivelul căruia se află genele pentru ARNr cloroplastic și acest segment de ADNcl apare sub forma unui satelit cu $\rho = 1{,}700$ g/m³ (Rawson și Haselkorn, 1973).

Prin tehnica cartării transcrierii genelor pentru ARNr cloroplastic 16 S și 23 S s-a determinat ordinea relativă a transcrierii acestora în cadrul unui transcripton și s-au localizat aceste gene pe harta genetică

Scanned with OKEN Scanner

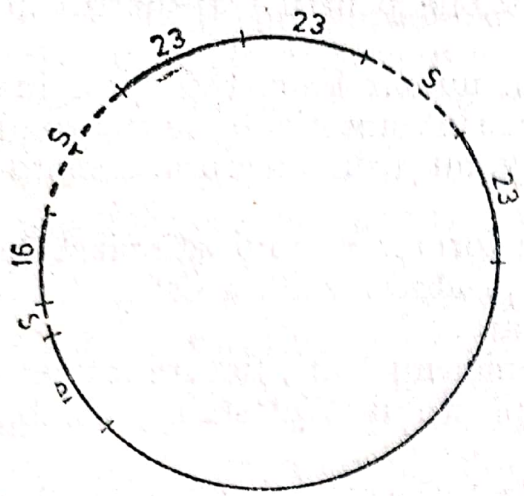


Fig. 44. Localizarea genelor pentru ARNr cloroplastic (16 S și 23 S) și segmente spațiatoare corespunzătoare (S) (modificat după Levine, 1972).

parțială a grupului de lincaj cloroplastic (fig. 44). Datele desprinse din experiențele cu actidion sau actinomicină D sugerează un aranjament randomizat al acestor gene (Surzycki și Rochaix, 1971) sau un aranjament în care gena ARNr 16 S precede gena ARNr 23 S, între care există un ADN spațiator, mai mare între copiile 16 S și mai mic între copiile genice 23 S.

Cercetări recente (Rawson, 1975) au reușit să determine fracțiunea transcrisă din ADNcl. Din secvența unică a ADNcl, suficientă spre a codifica cîteva sute de polipeptide de greutate moleculară medie, numai o mică fracțiune a capacității sale de codificare corespunde ARNr cloroplastic și altor gene cunoscute în prezent. S-au evidențiat două clase de mutanți ai genelor cloroplastice, și anume de rezistență la antibiotice și nefotosintetice care necesită acetat pentru creștere (Gillham și colab., 1978). Au fost cartate patru gene de rezistență la streptomicină, două pentru rezistență la eritromicină și una pentru rezistență la neamină (spectinomicină) în ordinea următoare: er-u-la-er-u-37-nr-u-2-1/spr-u-1-H-4-sr-u-2-23-r-sr-u-2-60-sr-u-sm 3-sr-u-s, 2. Rezistența la spectinomicină, neamină și streptomicină este conferită de subunitatea ribozomală mică, pe cînd rezistența la eritromicină, de subunitatea ribozomală mare, corespunzînd situației de la bacterii. Funcțiile fotosintetice sînt afectate în urma mutației la opt gene cloroplastice. La unii mutanți fotosintetici s-a evidențiat absența unor polipeptide ale membranelor tilacoide. O altă genă cloroplastică duce în urma mutației la blocarea formării ribozomilor cloroplastici, cu afectarea sintezei proteinice cloroplastice și absența activității fotosintetice.

Concentrația de ribozomi cloroplastici și intensitatea proceselor traducătoare ce se desfășoară pe aceștia condiționează capacitatea fotosintetizatoare a celulei.

Componenta proteinică a ribozomilor cloroplastici este sintetizată pe ribozomi citoplasmatici (Honeycutt și Margulies, 1973). Prin electroforeză bidimensională s-au separat proteinele ribozomale cloro-

Scanned with OKEN Scanner

plastice la *Chlamydomonas*, comparabile cu cele din ribozomii citoplasmatici. Ribozomul cloroplastic conține circa 26 proteine L în subunitatea mare și 22 proteine S în subunitatea mică, spre deosebire de cel citoplasmatic care conține 39 proteine ribozomale L și 32 S (Hanson și colab., 1974). Studiul genetic a trei tipuri de mutanți de *Chlamydomonas*, ce conferă rezistența la eritromicină ribozomilor cloroplastici, arată că doi din acești mutanți au comportament mendelian, în acest caz fiind implicate gene nucleare. Al treilea mutant se comportă nemendelian, rezistența la eritromicină fiind transmisă pe linie maternă, sugerînd implicarea genomului cloroplastic (ADNcl). Analiza electroforetică bidimensională arată că toți cei trei mutanți prezintă modificarea a cîte unei proteine ribozomale cloroplastice (Bogorad, 1975). De aici se poate desprinde concluzia că producerea de ribozomi cloroplastici funcționali este condiționată de interacțiunea genoamelor nuclear și cloroplastic.

Celulele de *Chl. reinhardi* crescute timp de patru generații în prezența rifampicinei pierd aproape total ribozomii cloroplastici, pe cînd populația de ribozomi citoplasmatici rămîne relativ neschimbată. Transcrierea ADNcl se realizează cu ajutorul ARN-polimerazei cloroplastice (Chambon, 1974). La porumb această enzimă este multimerică, avînd o greutate moleculară de 500 000 daltoni, fiind mult mai complexă structural decît enzima mitocondrială corespunzătoare. Dealtfel, genomul cloroplastic este mai complex decît cel mitocondrial.

În cloroplast s-au evidențiat ARNt cloroplastic și AA—ARNt-sintetaze specifice, diferite de cele citoplasmatice (Söll și Schimmel, 1974; Parthier și Krauspe, 1974). Dovada că unele din aceste enzime sînt sintetizate în citoplasmă sub control nuclear și apoi transferate în cloroplast este adusă de prezența Phe—ARN_t^{Phe}-sintetazei cloroplastice în cloroplastul unui mutant albinotic de *Euglena*, lipsit de ADNcl. S-a arătat că ADNcl poate codifica circa 20—30 tipuri diferite de ARNt la *Nicotiana* și circa 26 asemenea adaptori la *Euglena* (Schwartzbach și colab., 1976). Cloroplastul conține de asemenea ARNm cloroplastic, tradus în proteine pe ribozomi cloroplastici (Hartley și colab., 1975).

Studiul efectului antibioticelor la *Chl. reinhardi* a indicat faptul că atît transcrierea cît și traducerea la nivelul cloroplastului sînt esențiale pentru formarea unui organit funcțional. Lumina stimulează transcrierea ADNcl, fapt demonstrat la mutantul ac-20, dependent de acetat. Sinteza clorofilei, ferodoxinei, ferodoxin-NAPD-reductazei, fosforibulokinazei, carotenoizilor, β-carotenului, neoxantinei și troleinei este dependentă de ribozomii citoplasmatici.

Sistemul genetic cloroplastic ca și componentele aparatului fotosintetic cloroplastic sînt de origine hibridă — nucleo-cloroplastică (fig. 45) cu traducere cloroplasto-citoplasmatică.

Scanned with OKEN Scanner

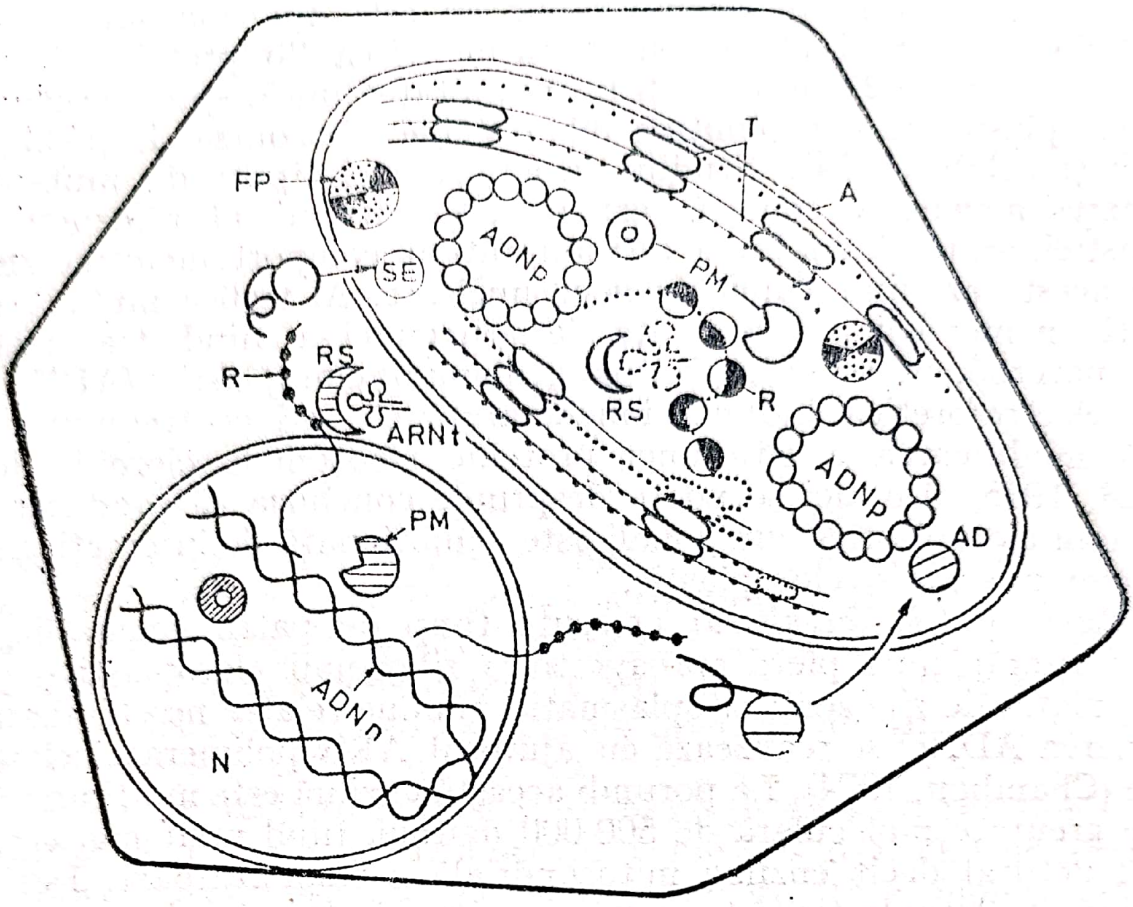


Fig. 45. Interdependența genomului nuclear cu cel cloroplastic în controlul constituenților plastidiali din cursul biogenezei cloroplastului. Liniile punctate — control exercitat de ADN cloroplastic sau plastidial (ADNp); liniile continue — control exercitat de ADN nuclear (ADNn); AD — DN-ază alcalină; A — membranele cloroplastului; FP — proteina fracția I; N — nucleu; PM — ADN și ARN-polimeraze; R — ribozomi și polizomi; RS — aminoacil — ARNt-sintetază; SE — enzime din stromă; T — tilacoide. Simbolurile haşurate desemnează constituenți cu specificitate nucleocitoplasmatică (după Parthier, 1977).

Pierderea ADNcl la tulpinile albinotice de *Euglena* ar indica faptul că funcția organitului nu este indispensabilă celulei, aceasta trecînd la heterotrofie. Dar raritatea acestui fenomen indică totodată faptul că funcția organitului este esențială pentru toate plantele verzi fotosintetizatoare.

Tratamentul celulelor de *Chlamydomonas* cu un mutagen chimic aplicat în timpul replicării ADNcl determină o creștere de 1,6 ori a frecvenței mutațiilor extranucleare.

Unele antibiotice afectează ribozomii cloroplastici ca rezultat al efectului fenotipic al variatelor mutații extranucleare de rezistență la antibiotice.

Totala independență a genomului cloroplastic este exercitată numai în cazul determinării structurii polinucleotidice a ADNcl, în sinteza ARNr cloroplastic și în sinteza subunității mari a proteinei fracțiunea I.

Scanned with OKEN Scanner

Celelalte componente ale aparatului fotosintetic sînt specificate fie de genomul nuclear singur (subunitatea mică a proteinei fracțiunea I), fie, în cele mai multe cazuri, de un control genetic dublu, nuclear și cloroplastic (proteine ribozomale cloroplastice, ARNt cloroplastic, lamelele și fotosistemele I și II, membrana cloroplastică etc.).

De asemenea, dublu control genomic nucleo-cloroplastic este posibil să se exercite și în replicarea, recombinarea și transcrierea ADNcl ca și în sinteza enzimelor solubile (fig. 45). Atît mutațiile nucleare cît și cele cloroplastice afectează asamblarea lamelelor și fotosistemelor, dar cele mai multe sînt pleiotrope, efectul lor primar nefiind cunoscut.

3. **Genomul mitocondrial.** Mitocondriile sînt organite celulare esențiale pentru viața celulei eucariote, deoarece în ele se desfășoară procesele respiratorii de bază care conduc la producerea de energie înmagazinată în ATP.

Ca și cloroplastele, mitocondriile se bucură de o relativă autonomie genetică, biogeneza lor aflîndu-se sub un control genetic dublu, nuclear și mitocondrial. Toate mitocondriile funcționale conțin ADN (foto XIX) a cărui cantitate este echivalentă cu aceea a plasmidelor bacteriene sau virusurilor.

În ultimul deceniu s-au obținut rezultate remarcabile în studiul genomului mitocondrial, reușindu-se chiar transferul intra- și interspecific de genom mitocondrial la *Saccharomyces*, ceea ce reprezintă o metodă perfecționată în studiul biochimic și genetic al mitocondriilor (Ferenczy și Maràz, 1977).

1. *Organizarea genomului mitocondrial.* Cromozomul mitocondrial sau ADN mitocondrial (ADNmt) apare sub forma unor structuri circulare monomerice, oligomerice sau de lanțuri concatenate (foto XX). ADNmt, ca și cel cloroplastic, este de tip procariot, adică necomplexat cu histone din care cauză apare în electronografii ca fibrile fine cu diametrul de 25—30Å, dispuse ca o rețea în regiuni discrete din matrixul mitocondriei, formînd nucleoidul acesteia (foto XIX).

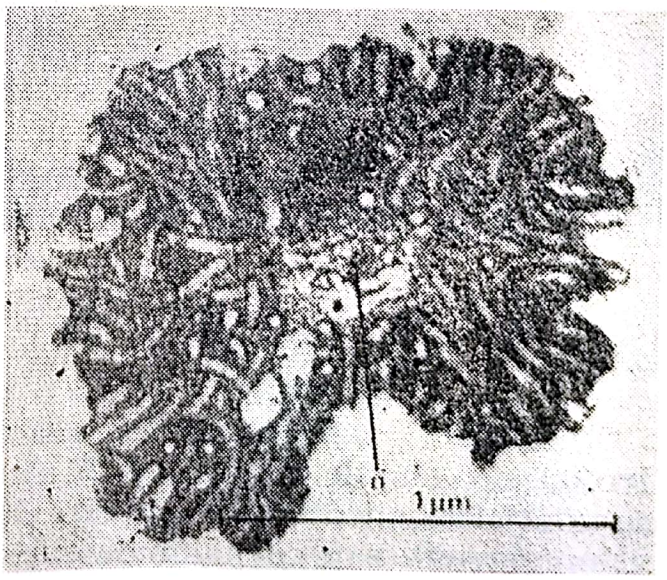


Foto XIX — **Electronofotografia unei mitocondrii izolate din celula de Tetrahymena, în care se remarcă ADN mitocondrial care apare la nivelul unui nucleoid(n) (după Charret, din Beale și Knowles, 1978).**

Scanned with OKEN Scanner

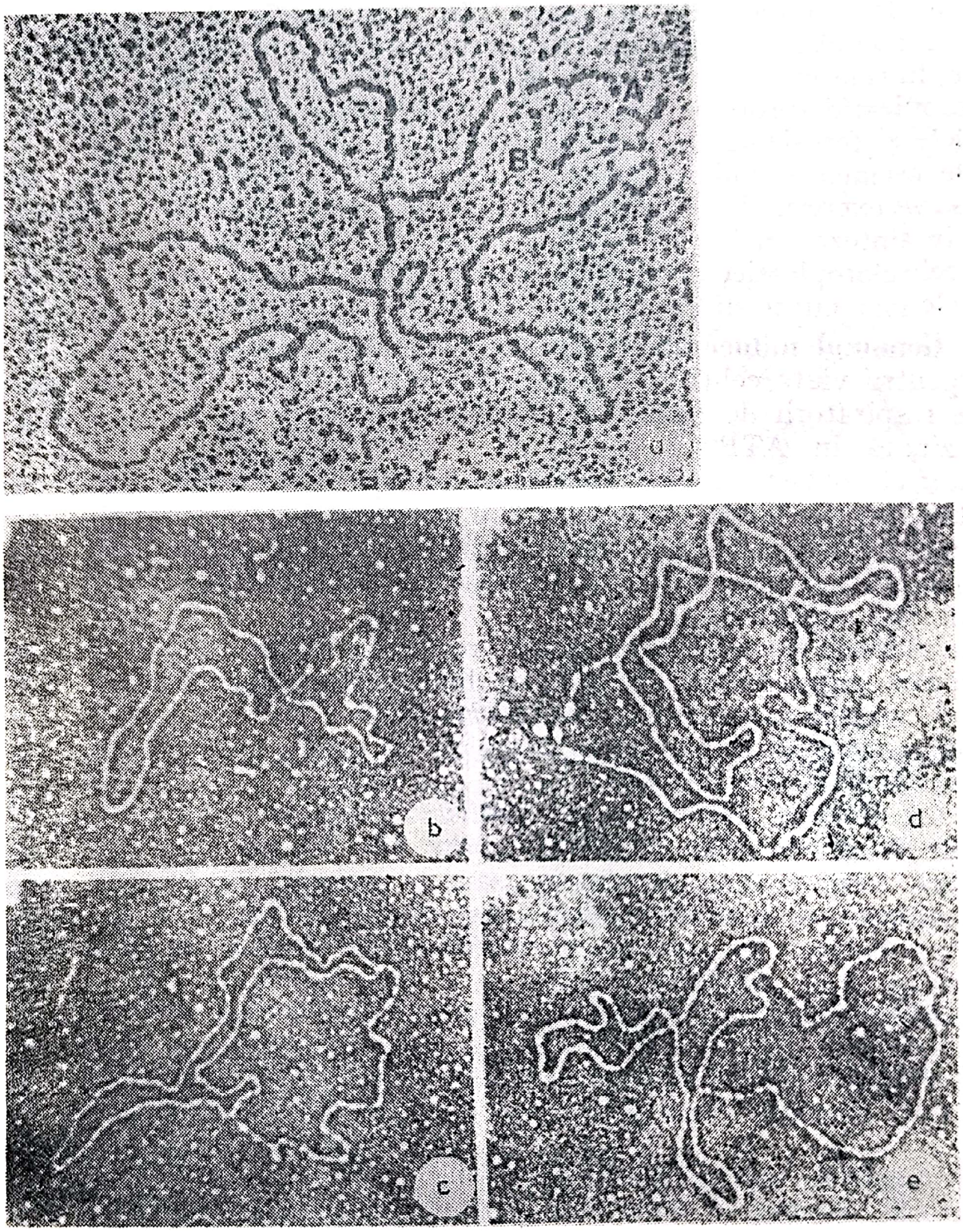


Foto XX — **ADN mitocondrial din ficat de şoarece (a) aflat în replicare** şi prezentînd bifurcaţii în segmentele A şi B, segmente care au circa 0,6 μm (după Kirschner şi colab., 1968) × 99 400; b-e — ADN mitocondrial în diferite stadii de replicare (după Gauze, 1977).

Circumferinţa monomerilor este de 4,7—5,5 μm, corespunzînd la 16 000 perechi de nucleotide (Nass, 1969; Gauze, 1977). În aceeaşi populaţie de mitocondrii, alături de structurile ADNmt circulare covalent închise sau covalent deschise pot să apară şi structuri liniare.

Scanned with OKEN Scanner

Tranzițiile conformaționale au la bază acțiunea combinată a endonucleazelor și ligazelor. Creșterea frecvenței dimerilor circulari și a formelor catenane este adesea legată de proliferarea malignă (Clayton și Vinograd, 1967). ADNmt al metazoarelor este de tip AT, conținutul său în G + C fiind variabil: de la 2% (la drosofilă) la 50% (la unii pești și păsări). Dublul-helix ADNmt are o catenă grea — H — cu ρ = = 1,736 g/cm³, bogată în resturi A, și o catenă ușoară — L — cu ρ = = 1,716 g/cm³, fiind bogată în resturi T. ADNmt este singurul ADN circular ce are în secvența sa ribonucleotide covalent integrate, făcîndu-l sensibil la uree și RN-ază și modificînd geometria locală a spiralei, oferind astfel situri de recunoaștere pentru polimeraze. La ciuperci ARNmt apare ca structură circulară: la *Saccharomyces* ADNmt poate trece într-o stare dispersată cu molecule circulare mai mici și molecule liniare cu capete adezive ; la *Aspergillus* și *Neurospora*, în urma extracției, ADNmt circular poate trece în forma liniară sau circular deschisă ca și la (*Physarum polycephalum*) (Luck, 1964; Evans și Suskind, 1971; Blamire și colab., 1972). Acest ADNmt prezintă densități de plutire variabile: la drojdii între 1,698 și 1,706 g/cm ; la *Neurospora*, ρ = 1,701 g/cm³ ; la *Aspergillus* 1,690 ; la *Saprolegnia* 1,685, iar la *Dictyostelium discoideum* ρ = 1,688 g/cm³. Genomul mitocondrial al drojdiilor și ciupercilor prezintă în cea mai mare parte secvențe unice. La protiste cel mai bine studiat este ADNmt la *Tetrahymena* și *Paramecium*. La *Tetrahymena pyriformis* ADNmt este liniar, are o lungime de 17;6 μm și o GM = 30 000 daltoni. Este bogat în AT (circa 75%) avînd o densitate de plutire de 1,686 g/cm³. Cu excepția unor repetiții inversate care stau la baza formării, după denaturare, de structuri circulare, ADNmt de *Tetrahymena* nu are secvențe repetate. La *P. aurelia* ADNmt are o GM =35 000 daltoni, ρ = 1,699 g/cm³ și apare prin extracție ca molecule liniare lungi de 13,8 μm. La *Euglena*, ADNmt circular, prin extracție, devine liniar. Are un perimetru de 1—2 μm, și ρ = 1,690—1,691 g/cm³, fiind unul dintre cele mai mici ADNmt (Edelman și colab., 1966). Sînt însă multe controverse privind dimensiunea sa, urmare a imperfecțiunii metodelor de extracție și analiză. Are un conținut G + C = 30%.

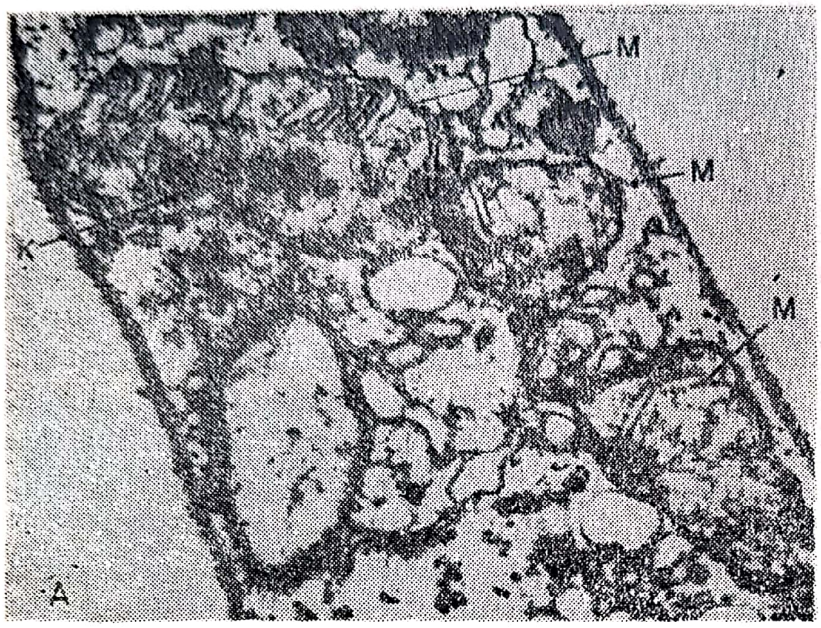
La *Chlamydomonas*, ADNmt este o moleculă circulară cu perimetrul de 4,6 μm și cu ρ = 1,706 g/cm³. El are un conținut mediu G + C de 46% și o GM = 16 000 daltoni.

La plantele superioare ADNmt are formă circulară, o densitate de plutire uniformă (ρ = 1,705—1,706 g/cm³) și o greutate moleculară de 60—140 × 10^6 daltoni (Francisc și Vedel, 1977). Conținutul G + C este de asemenea uniform (45—47%) iar Tm = 88 °C, ceea ce denotă absența bazelor neobișnuite modificate și marele conservatorism al secvențelor nucleotidice din ADNmt al liniei vegetale. Cinetica renaturării ADNmt indică absența de secvențe repetate și omogeni-

Scanned with OKEN Scanner

tatea sa mai mare faţă de ADN nuclear (Corneo şi colab., 1966). Hărţile de restricţie pentru ADNmt arată că fiecare individ prezintă o clonă moleculară unică de ADNmt.

2. *ADN kinetoplastic* (ADNk). În kinetoplast (structură localizată într-o regiune modificată a mitocondriei de *Trypanosomidae*) s-a



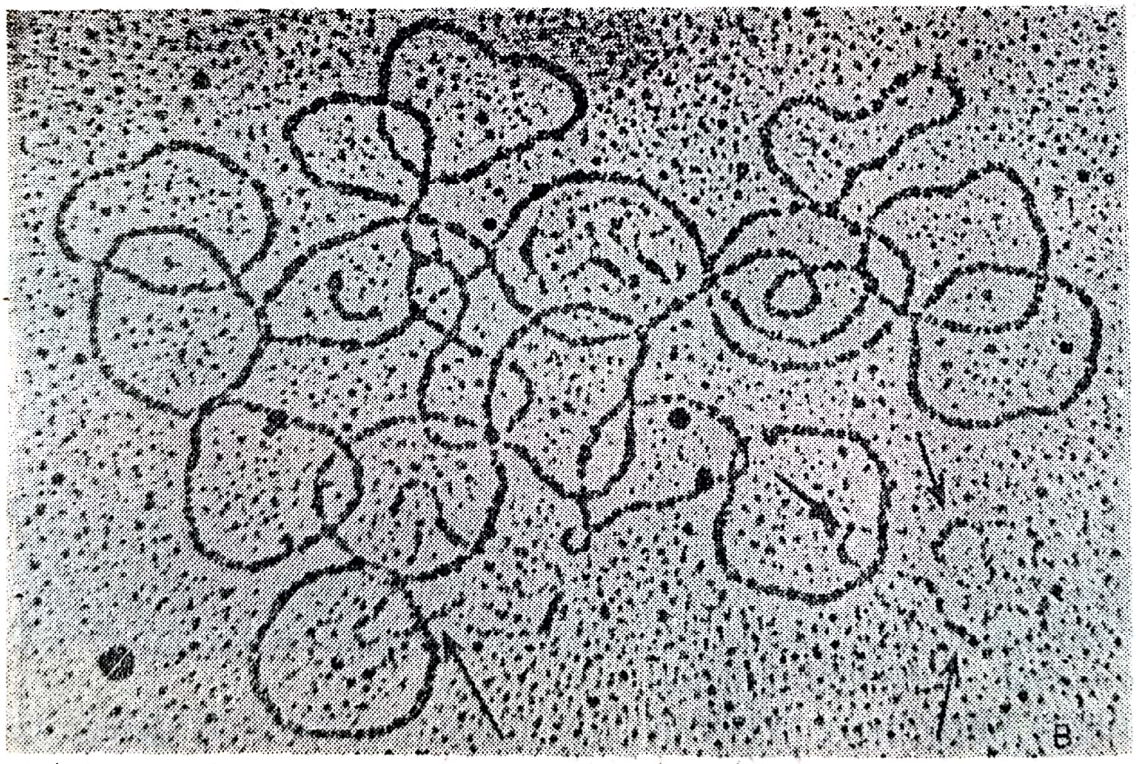


Foto XXI — A — **Electronofotografie prezentînd o secţiune longitudinală printr-o formă sanguină de Trypanosoma lewisi,** în care se observă kinetoplastul ce constă dintr-o masă de ADN (K) localizată într-o regiune specifică a unei mitocondrii mărite şi modificate (M) (după H.C. Renger, şi D. R. Wolstenholme, „J. Cell Biol.", 47, 689, 1970). B — **ADN kinetoplastic de Trypanosoma cruzi,** prezentînd minicercuri caracteristice, unele native, altele cu bucle de denaturare (săgeţi). Unele cercuri apar catenate, altele covalent lincate (după Chr. Brack, şi E. Delain, „J. Cell Sci.", 17, 287, 1975).

Scanned with OKEN Scanner

evidențiat de asemenea prezența de ADN care a fost numit ADN kinetoplastic. Acest grup de protozoare a fost numit Kinetoplastidae, ele avînd mitocondrii mari, transformate (kinetoplaste), (foto XXI), așezate în imediata vecinătate a bazei flagelare sau în contact cu capătul proximal al flagelilor, distingîndu-se de corpii bazali flagelari sau kinetosomi (Clark și Wallace, 1960). Fiecare celulă de protozoare din acest grup conține cîte un singur kinetoplast. În matrixul kinetoplastelor, în apropiere de membrana internă se află ADN kinetoplastic evidențiat electronomicroscopic de Rio și Delain (1969). ADNk poate fi evidențiat și prin colorare Feulgen sau acridin-orange.

La *Trypanosoma cruzi*, ADNk reprezintă 15—20% din ADN celular total. El are $\rho = 1,699$ g/cm³, deosebindu-se net de ADN nuclear care are $\rho = 1,721$ g/cm³. ADNk constă dintr-un număr mare de minicercuri (10^4 per celulă) imbricate, avînd un diametru de 0,25 μm la *T. brucei* și 0,8 μm la *Crithidia luciliae*, și din cercuri mai mari de circa 11 μm lungime de contur, acestea fiind comparabile cu ADNmt al altor specii (Steinert și Assell , 1975 ; Kleisen și colab., 1976).

La *C. luciliae*, populația de molecule de ADNk este eterogenă (Francis și Vedel, 1977). După Kallinikova (1974) ADNk este un tip distinct de ADN extranuclear, prezentînd unele caracteristici ale organizării mezocariote.

Mutantele diskinetoplastice de *Trypanosoma* prezintă deficiențe respiratorii (Hajduk, 1976), acestea fiind lipsite de ADNk detectabil prin metodele citochimice uzuale, el fiind însă evidențiat numai în urma formării unor complexe macromoleculare fluorescente cu 4,6—diamidino-2-fenil-indol (DAPI). În acest caz, ADNk rămas apare ca un șir de particule. În mod normal ADNk apare ca o bandă fibroasă. Numai formele care respiră în sîngele de mamifere printr-un sistem nonmitocondrial—1-α-glicerofosfat oxidaza — pot supraviețui pierderii ADNk. S-a sugerat că ADNk oferă anumite componente necesare pentru dezvoltarea mitocondriilor în stadiul în care tripanosomele se află în insecte vectoare și în gazda vertebrată la speciile de *Trypanosoma* și *Leishmania* care au un tip mitocondrial de respirație, dar acest ADNk este dispensabil și posibil nefuncțional în faza din circulația sangvină a mamiferelor.

Nu există informație privind produșii de transcriere ai ADNk. Nu se știe de asemenea care este semnificația minicercurilor din acest ADN. ADNk este bicatenar asociat cu unele proteine asemănătoare histonelor. Hibridează în proporție de 40—70% cu ADN nuclear, replicîndu-se sincron cu acesta.

Omologia ADN mitocondrial (ADNmt) și transmiterea sa preferențială pe linie maternă. La eucariotele inferioare apare, cu unele excepții, un exces de ADNmt cu toate că nu a fost încă dovedită prezența de secvențe repetate sau de copii genice multiple. Acest exces poate fi reprezentat de secvențe spațiatoare

Scanned with OKEN Scanner

noninformaționale bogate în AT care pot sta la baza fenomenelor recombinatorii intragenomice mitocondriale.

Omologia dintre ADNmt de la protiste și metazoare este mică (0,3% între *Xenopus laevis* și echiuridul *Urechis caupo*). O omologie mai mare apare între genomul mitocondrial de om și cel de șoarece (5—50%).

Deși separate de 50 milioane de ani, între speciile *Xenopus laevis* și *X.mulleri* se realizează hibrizi viabili. Dar omologia dintre genomul lor mitocondrial este limitată la numai 20%, hibrizii moștenind ADNmt pe linie maternă.

Transmiterea preferențială pe linie maternă a ADNmt a fost demonstrată electroforetic prin studiul fragmentelor rezultate în urma acțiunii endonucleazelor de restricție, din ADNmt de la armăsar, măgăriță și catîr. Electroforegrama ADNmt de catîr este asemănătoare cu aceea a ADNmt de măgăriță.

Capacitatea de codificare a ADNmt la metazoare este comparabilă cu aceea a unor bacteriofagi de mărime medie, dar de cîteva ori mai mică decît a genomului cloroplastic. Din această cauză, participarea ADNmt în biogeneza mitocondrială este limitată (Borst, 1972; Wintersberger, 1973).

3. *Replicarea ADNmt.* Sinteza ADNmt se desfășoară pe parcursul întregului ciclu celular (Braun și Evans, 1969; Kuroiwa, 1974; Braun și colab., 1977), sinteza sa fiind legată de diviziunea organitului (realizată după modelul bacterian), nu de cea a celulei, celula avînd o populație eterogenă de mitocondrii. Sinteza ADNmt cunoaște totuși un maxim la sfîrșitul lui S și mai ales în G_2. La *Euglena* însă, sinteza ADNmt prezintă un maxim restrîns în mijlocul lui S.

Replicarea ADNmt este semiconservativă și se desfășoară de regulă după un model Cairns modificat (Borst, 1972). La drojdii și *Euglena,* însă, s-a constatat că replicarea ADNmt se face după un model dispersiv care implică un schimb simultan de catene omoloage între duplexurile fiice, segmente ale catenelor ușoare unindu-se covalent cu segmente ale catenelor grele (Richards și Ryan, 1974). ADNmt se replică de 1,5 ori mai rapid decît cel nuclear, prezentînd un turnover mai rapid. Modelul dispersiv de replicare stă la baza recombinării intragenomice mitocondriale. Nu s-a putut da pînă în prezent vreo explicație instabilității metabolice mai mari și căii dispersive de replicare a ADNmt, aspecte care se abat de la principiile generale de funcționare a materialului ereditar.

Pe baza studiului electronomicroscopic al ADNmt în replicare a fost elaborat modelul buclei D (fig. 46) de către Kasamatsu și colab. (1971) și Kasamatsu și Vinograd (1974). După Robberson și colab. (1972), prima etapă în replicarea ADNmt este „îndepărtarea" la un sit anumit a uneia dintre catenele complementare ale ADNmt (de regulă catena ușoară —L—) care nu este activă ca matriță și care

Scanned with OKEN Scanner

apare ca o buclă (*displacement loop*). Aceasta a fost numită bucla D și prin mărirea ei ADNmt trece din tipul ADNmt D în ADNmt — Exp. D, făcînd posibilă replicarea catenei complementare (catena grea, H, sau catena E în cadrul acestui model). Replicarea catenei ușoare, L, respectiv a buclei (D), are loc mai tîrziu dar în aceeași direcție (replicare unidirecțională). Se separă două molecule fiice α și β, una circulară și dublu-catenară și alta circulară parțial monocatenară. Prin activitatea ulterioară a ADN-polimerazei și ADN-ligazei iau naștere două molecule fiice circulare, covalent închise. Este deci o replicare asimetrică. Replicarea ADNmt — Exp. D durează 120 minute. Bucla D a fost pentru prima dată descrisă la ADNmt de metazoare, dar apare și în cazul replicării ADN cloroplastic de mazăre ca și în replicarea ADN λ, ea reprezentînd un intermediar replicativ stabil. Procesul replicării ADNmt este oarecum diferit la două ciliate, *Tetrahymena* și *Paramecium* (fig. 46). La *Tetrahymena* replicarea începe la mijlocul moleculei liniare de ADNmt și se desfășoară simultan în ambele direcții, apărînd un intermediar replicativ de tip „ochi". La *Paramecium*, replicarea este unidirecțională, începînd la un capăt, rezultînd un intermediar replicativ de tip „lariat". Studii electronomicroscopice au demonstrat atașarea ADNmt la membrana mitocondrială în punctele de inițiere a replicării. Membrana mitocondrială este de asemenea implicată în repartizarea produșilor de replicare în organitele fiice. La *Tetrahymena* ADNmt se replică bidirecțional, evidențiindu-se electronomicroscopic „ochiuri" de replicare cu o porțiune monocatenară, acolo unde nu a fost inițiată încă formarea fragmentelor Okazaki. La *Paramecium* replicarea este unidirecțională cu sinteza continuă pe catena *leading* și sinteza discontinuă pe catena *lagging*.

La mutantele „petite" de drojdie a fost admisă replicarea ADNmt după tipul inelului rotativ.

Biochimia replicării ADNmt este foarte puțin cunoscută. Există o ADN-polimerază mitocondrială care este codificată, cel puțin la drojdie, de genomul nuclear, fiind sintetizată pe ribozomi citoplasmatici. Codificarea în genomul nuclear a ADN-polimerazei mitocondriale este dovedită de absența oricăror deosebiri dintre proprietățile enzimei izolate din mitocondrii ale celulelor normale și ale enzimei izolate din mitocondrii ale celulelor „petite" (mutante ρ^-) care au pierdut în cea mai mare parte ADNmt și prezintă deficiențe respiratorii. Greutatea moleculară a ADN-polimerazei mitocondriale de drojdie este de 150 000—170 000 daltoni. Ea este mai mică decît enzima citoplasmatică corespunzătoare și este asociată cu membrana mitocondrială. În celulele HeLa, ADN-polimeraza mitocondrială este și mai mică (GM = 106 000 daltoni). Nu se știe dacă ADN-polimeraza mitocondrială, asemănător ADN-polimerazei I bacteriene, prezintă și activități exonucleazice.

Scanned with OKEN Scanner

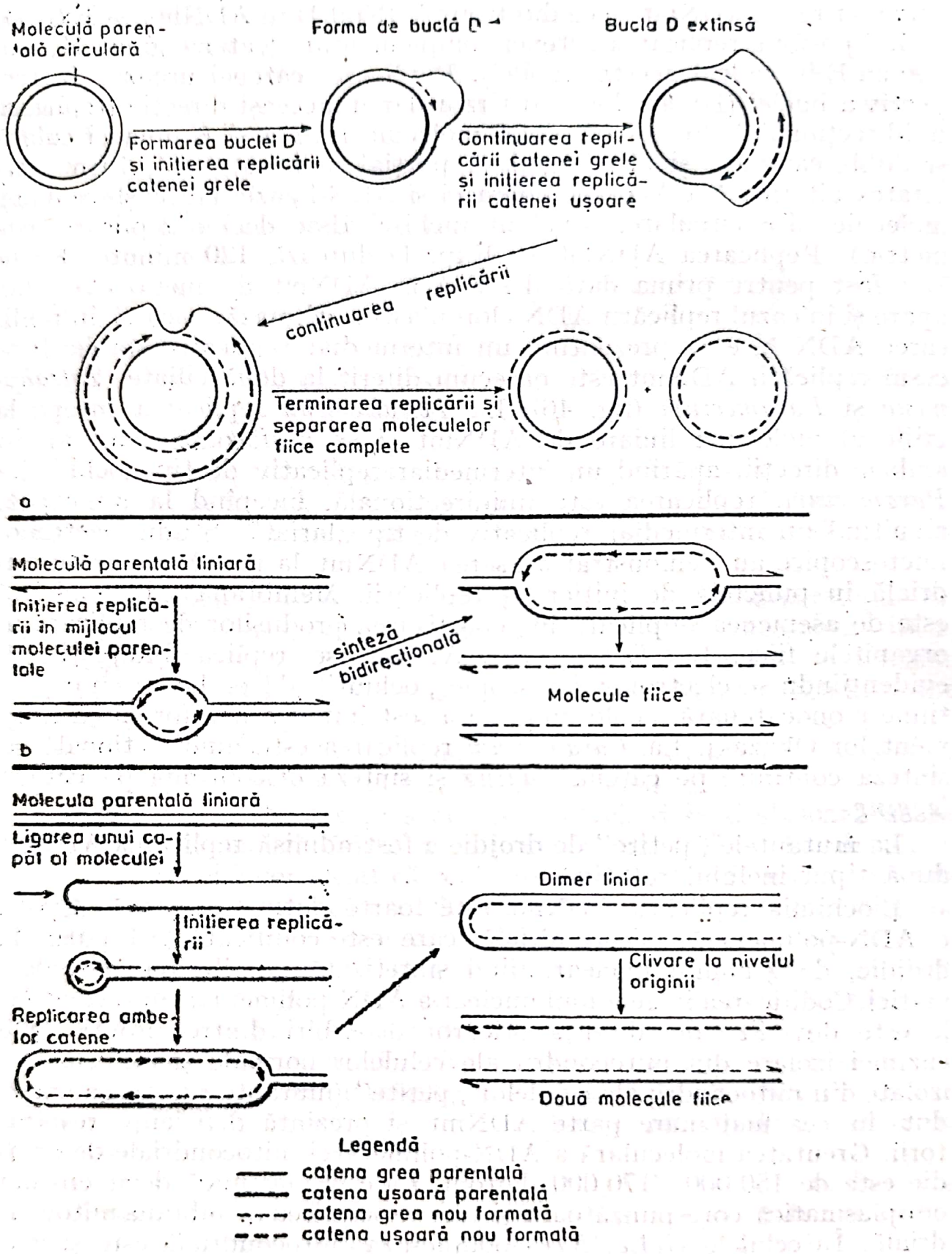


Fig. 46. **Modele de replicare a ADN mitocondrial** (după Beale și Knowles, 1978) : a = modelul buclei D la șoarece ; b = modelul bidirecțional la *Tetrahymena* ; c = modelul unidirecțional la *Paramecium*.

Scanned with OKEN Scanner

Sub acțiunea cicloheximidei, sinteza ADN nuclear este blocată, pe cînd aceea a ADNmt continuă încă 5 ore (Grossman și colab., 1969; Borst, 1972). Transferul drojdiilor crescute anaerob pe un mediu bogat în O_2 duce la o creștere bruscă în rata sintezei ADNmt.

Sinteza ADNmt este foarte mult intensificată în timpul dezvoltării oului fecundat la *Xenopus*. În mitocondriile de drojdie, și *Tetrahymena*, nu însă și în cele din celulele metazoarelor, s-a evidențiat un aparat enzimatic de excizie-reparare activ în repararea leziunilor induse în ADNmt de către razele γ sau bruneomicină.

Electronomicroscopic pot fi deosebite moleculele de ADNmt aflate în replicare de cele care se află în sinteza reparatorie, primele fiind predominant circular covalent închise, cele de pe urmă fiind predominant circular deschise.

4. *Mutageneză*. Genomul mitocondrial suferă alterări sub influența diferiților factori. Astfel, insuficiența în Cu provoacă apariția de mitocondrii gigantice — metamitocondrii, cu diametrul 5—8 μm — al căror ADNmt se deosebește de cel al mitocondriilor normale.

Cu ajutorul manganului se induc în mod specific mutante „petite". Mutațiile punctiforme stau la baza rezistenței la antibiotice.

Mutantele „petite" de *Saccharomyces cerevisiae* au fost notate cu „ρ^-" și s-a considerat că sînt determinate de un factor citoplasmatic. Coloniile mutante „petite" prezintă o creștere mult mai înceată față de coloniile normale, fiind mai mici și avînd un aspect translucid, prezentînd deficiențe în sistemul respirator. Ele, deși au nealterat citocromul c, au pierdut unii citocromi ($a + d_3$ și b) și prezintă deficiență în sistemul de sinteză proteinică mitocondrială. S-a arătat că mutantele „petite" de drojdie au la bază profunde alterări (deleții mari) în ADNmt (Goldring și colab., 1970; Fukuhara și colab. 1973; Borst, 1974), ceea ce face ca densitatea de plutire a ADNmt „petite" să fie cu totul diferită de aceea de la tipul normal.

Mutantele „petite" neutre (ρ^0) și supresive (ρ^-) se datoresc pierderii sau modificării unui factor genetic citoplasmatic desemnat pînă de curînd ρ (rho), pe cînd mutantele „petite" segregaționale se datoresc mutațiilor genice nucleare, ele posedînd factorul ρ citoplasmatic normal. Astăzi se știe că acest factor ρ este ADNmt, iar petitele neutre au pierdut tot ADNmt, pe cînd cele supresive prezintă un genom mitocondrial cu multe deleții și duplicații (Nagley și Linnane, 1972).

ADNmt rămas în urma deleților la mutantele „petite" suferă un proces de amplificare intramoleculară compensatoare, devenind, deși diferit calitativ de cel normal, un ADN repetitiv (Beale și Knowles, 1978) și făcînd ca la asemenea mutante să fie uneori aceeași cantitate totală de ADNmt ca la tipul normal. Harta denaturării acestui ADN prezintă regiuni bicatenare, lungi de 0,03 μm, intercalate cu regiuni despiralizate de 0,18 μm. Există și specii „petite" negative de *Sac-*

Scanned with OKEN Scanner

charomyces, incapabile de a suferi această mutație. Se admite că al asemenea specii, pierderea unor segmente ADNmt este incompatibilă cu viața celulei, din care cauză nu se pot izola mutante „petite" viabile.

În afara tipului de mutație „petite", mai există deficiențe în sistemul respirator al drojdiilor cauzate de mutații care implică mici segmente de ADN sau mutații punctiforme (Tzagoloff și colab., 1975).

Mutantele de drojdie rezistente la antibiotice sînt capabile de a crește în concentrații ale acestora care de regulă omoară celulele normale. Unele din aceste mutante sînt determinate de mutații în genele nucleare, pe cînd altele sînt determinate de mutații ale genelor mitocondriale. Sub acțiunea antibioticelor, precum oligomicina, venturicidina și tri-etil-til, sînt inhibate anumite componente ale complexului ATP-azic (fig. 49), pe cînd antimicina inhibă transferul de electroni dintre citocromul b și citocromul c. Analiza genetică și studii cu ADNmt în care a fost considerat și efectul bromurii de etidium au demonstrat că rezistența la alte antibiotice, cum ar fi eritromicina, este de asemenea determinată atît de gene mitocondriale, cît și de gene nucleare.

La *Neurospora* a fost descrisă mutanta poky care prezintă pe lîngă deficiențe respiratorii și alterări în unele proteine ale ribozomilor mitocondriali.

Tot unele alterări în ADNmt stau la baza fenomenului de senescență evidențiat la ciuperca *Podospora* (Dujon și Michaelis, 1974).

Studiul încrucișărilor mono-, bi- și trifactoriale (Linnane și colab., 1974) și analiza densității de plutire a ADNmt al formelor hibride, rezultate din încrucișarea a două mutante ρ^- de drojdie, sau din încrucișarea unor celule om-șoarece, au permis evidențierea fenomenului de recombinare genetică în cadrul genomului mitocondrial. S-a stabilit că ADNmt de la hibrid are o densitate de plutire intermediară între formele genitoare.

La drojdie, recombinarea genetică mitocondrială se realizează în zigot sau în mugurii timpurii ai zigotului (Dujon și Michaelis, 1974; Fukuhara și colab., 1974; Borst, 1974). Segregarea liniilor pure genetic are loc rapid în timpul primelor diviziuni după formarea zigotului. În unele cazuri starea heteroplasmatică se păstrează circa 19 — 20 diviziuni celulare. La baza procesului recombinării intragenomice poate sta modelul dispersiv de replicare a ADNmt de la drojdie, populația de molecule ADNmt dintr-o celulă apărînd ca un complex ansamblu panmictic de gene mitocondriale, unele fragmente de ADNmt fiind eliminate în citoplasmă prin acest mod dispersiv de replicare și reprezintă adevărate „plasmide" mitocondriale.

5. *Recombinare și cartare genetică mitocondrială.* În identificarea genelor structurale mitocondriale și construirea de hărți fizice și

Scanned with OKEN Scanner

genetice ale genomului mitocondrial s-a recurs la procedee genetice, precum mutația și recombinarea (folosind mutante de rezistență la antibiotice sau mutante termosensibile) și analiza deleţiilor „petite" ca și a diferiților markeri, precum așa-numitul marker de salvare (Linnane și colab., 1978). Studiile fizice ale ADNmt au implicat studiul electronomicroscopic și biofizic al hibrizilor ADN—ARN și ADN—ADN, ca și analiza acțiunii enzimelor de restricție.

Prin injectarea de mitocondrii de la o formă de *Paramecium* rezistentă la antibiotice la alta snesibilă, celulele receptoare cultivate pe mediu cu antibiotic devin după 4 — 15 zile permanent rezistente. În acest caz, mitocondriile celulei gazdă au fost înlocuite de mitocondriile injectate. Linii rezistente pe linie citoplasmatică la cloramfenicol au fost obținute și la celulele HeLa și celule de șoarece. În acest caz s-au obținut și recombinanți apăruți pe cale citoplasmatică.

Sînt date după care mitocondriile spermatozoidului, după pătrunderea în ovul, în timpul fecundării, se dezintegrează. La hibrizii interspecifici cal-măgar după fecundare, ADNmt al spermatozoidului se dezintegrează (Huttchinson și colab., 1974), fapt dovedit prin analiza ADN mitocondrial supus acțiunii endonucleazelor de restricție. Cartarea fragmentelor ADNmt rezultate în urma acțiunii restrictazelor arată că ADN de la hibrizii reciproci (catîr și bardou) prezintă un model de restricție asemănător ADNmt de la genitorul matern. Același fapt a fost evidențiat la hibrizii reciproci *Xenopus laevis x X.mülleri*. În unele cazuri s-a putut însă evidenția și recombinarea în celulele somatice (hibrizi celulari) a ADNmt patern și matern. La *Paramecium*, schimbul de citoplasmă în procesul de conjugare condiționează și schimb de mitocondrii cu posibilităţi ulterioare de recombinare. La drojdii ca și la *Chlamydomonas*, formarea zigoților implică un amestec total al conținutului celor două celule gametice, mitocondriile ambilor părinți participînd în creșterea hibrizilor celulari, iar posibilitatea de recombinare genetică mitocondrială este mare.

Recombinarea de gene mitocondriale a fost dovedită la drojdie prin experiențe de încrucișare între o tulpină ce poartă markerul mitocondrial de rezistență la cloramfenicol și alta eritromicino-rezistentă. Din asemenea încrucișare apar unii diploizi care prezintă dubla rezistență la eritromicină și cloramfenicol, iar alții care sînt sensibili la ambele antibiotice. Dacă dubla rezistență a celulelor hibride are la bază prezența în acestea a unui amestec de mitocondrii de la ambii genitori, celulele dublu sensibile nu pot să apară decît ca rezultat al unei recombinări intermitocondriale, mutația fiind exclusă prin experiențe de control pe celule haploide. Există un fenomen de polaritate a transmiterii și a recombinării genelor mitocondriale pentru rezistența la cloramfenicol (CAP) și eritromicină (ERY) dato-

Scanned with OKEN Scanner

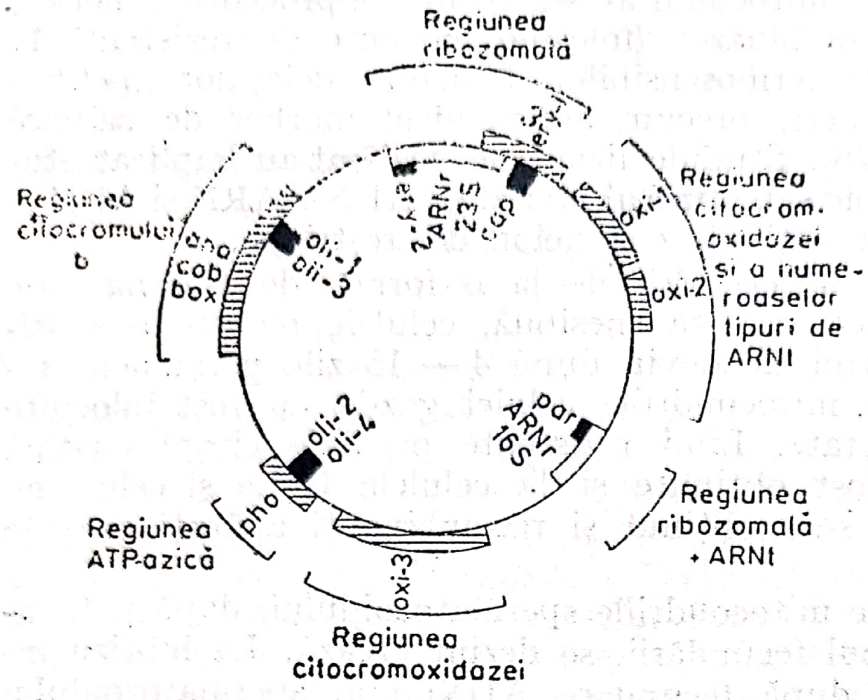


Fig. 47. **Reprezentarea hărții genetice provizorii a ADN mitocondrial de drojdie** (după Beale și Knowles, 1978). Simboluri ale genelor: cap = rezistență la cloramfenicol; ery = rezistență la eritromicină; oli = rezistență la oligomicină; par = rezistență la paromomicină; oxi = citocromoxidază; cob = citrocom b; ana = antimicină A; box = citocrom b și citocromoxidază; pho = ATP-ază oligomicin — sensibilă; ω (omega) — polaritatea factorului de sex.

Legendă

- markeri de rezistență la antibiotice localizați definitiv prin studii de deleție și recombinare și folosiți ca markeri de referință pentru localizarea altor gene
- gene pentru ARN
- gene (simbolurile din afară) localizate în cadrul regiunilor studiate, dar a căror localizare și ordine exactă sînt încă cercetate

Eat unui proces de conversie nereciprocă care apare la hibrizi și care schimbă un factor de polaritate special sau factor de sex ω (omega), strîns lincat de locusul cap, din ω^- în ω^+, cu afectarea genelor adiacente locusului ω. Polaritatea descrește rapid cu distanța de la ω. Dacă alela cap^+ este pe aceeași catenă a ADNmt cu ω^+, cea mai mare parte a descendenței recombinate va fi cap^r; dacă cap^s este pe aceeași catenă cu ω^+, cea mai mare parte a descendenței va fi cap^s. Gena ery fiind plasată la o distanță mai mare de ω prezintă o tendință de polaritate asemănătoare, dar mai puțin marcantă.

Sînt puține lucruri înțelese în cadrul mecanismului de recombinare a ADNmt.

Prin analiza genetică, electronomicroscopică și biofizică, precum și prin studii de hibridare ADN—ARN sau în care s-a urmărit acțiunea endonucleazelor de restricție s-au evidențiat și cartat gene structurale mitocondriale (fig. 47) care specifică subunități ale citocromoxidazei, citocromului b, ATP-azei mitocondriale, ARNr și ARNt mitocondriali etc.

Scanned with OKEN Scanner

Distanța fizică ce separă anumite elemente pe harta genetică poate fi estimată cu referire la harta structurală determinată prin endonucleaze de restricție. La drojdii nu s-a reușit să se izoleze ADNmt într-o singură piesă și, ca urmare, în acest caz nu s-au putut aplica metodele de cartare prin studiul electronomicroscopic al structurilor heteroduplex. De asemenea, tot în acest caz, pluralitatea evenimentelor recombinaționale din genomul mitocondrial face dificilă aprecierea distanței dintre markerii de rezistență prin procente de recombinare căci markerii care nu sînt apropiați pot apărea nelincați deși sînt localizați pe aceeași catenă ADNmt. Asemenea dificultăți sînt create și de sistemul de polaritate care complică estimarea frecvențelor de recombinare a markerilor localizați în vecinătatea lui ω. Absența completă a recombinării, pe de altă parte, reprezintă un indiciu al alelismului. Cu aceste limite s-a alcătuit totuși o hartă genetică a grupului de lincaj mitocondrial care are formă circulară și care a fost împărțită în mai multe regiuni (fig. 47), deși ordinea în genom a acestor regiuni nu este deocamdată cert stabilită. Molloy și colab. (1975) au folosit stocuri petite apărute spontan spre a obține date asupra secvenței genelor din genomul mitocondrial bazați pe principiul că două gene situate în intimă vecinătate prezintă o mai mare probabilitate de a fi pierdute simultan în urma unei deleții decît două gene separate de o distanță mare. Pe această cale au fost localizate multe gene pe harta genetică mitocondrială (Schweyen și colab., 1976; Tremboth și colab., 1976).

Genele pentru ARNr și ARNt mitocondriali au fost cartate prin metoda analizei hibridării ADNmt de la diferitele mutante petite cu aceste tipuri de ARN (Faye și colab., 1975). Aceste studii de cartare arată că genele pentru cele două tipuri de ARNr mitocondrial sînt dispuse la mare distanță în genomul mitocondrial. Folosindu-se analiza acțiunii endonucleazelor de restricție, s-a realizat o cartare „fizică" a genomului mitocondrial, aceste enzime acționînd în puncte specifice asupra ADNmt (Sanders și colab., 1976).

La animalele superioare nu s-a putut realiza o cartare a genelor mitocondriale. Prin studii de hibridare ARNmt/ADNmt s-au obținut unele informații privind localizarea genelor mitocondriale pentru ARNr și ARNt mitocondriali în celulele HeLa (Wu și colab., 1972). Catena grea (H) a ADNmt poartă două gene pentru ARNr, 12 S și 16 S, localizate adiacent, separate doar de un mic spațiu și 12 situri pentru ARNt (4 S) dintre care unul plasat în spațiul dintre genele pentru ARNr 12 S și ARNr 16 S. Catena ușoară (L) poartă alte 7 situri pentru ARN 4 S care sînt separate de spații mari (Attardi și colab., 1976).

La *Xenopus laevis*, folosind aceleași metode, Dawid și colab., (1976) au putut carta cele două gene ribozomale adiacente, pe catena H, folosindu-se și de o hartă fizică bazată pe studii cu endonucleaze

Scanned with OKEN Scanner

de restricție. Totodată au fost delimitate circa 15 situri pentru ARN 4S pe catena H și 5—6 pe catena L. Se apreciază că genomul mitocondrial de drojdie are circa 70 loci genici, dintre care doar cîțiva au fost cartați pînă în prezent.

Se remarcă faptul că la drojdie, genele pentru cele două tipuri de ARNr sînt larg separate, pe cînd la *Xenopus* și om ele sînt adiacente, așa cum sînt și la bacterii ca și în genomul nuclear eucariot (Birnstiel și colab., 1971; Jaskunas și colab., 1974).

Regiunea W (unitățile fizice de cartare 0 — 5) și regiunea ATP-ază/citocrom b (unitățile fizice de cartare 18 — 36) (fig. 47) prezintă frecvențe foarte mari de recombinare, conținînd situri la care secvențele ADN pot fi integrate sau deletate fără a fi afectată capacitatea respiratorie. Gena care specifică subunitatea 9 a ATP-azei mitocondriale (fig. 49) are efect pleiotropic asupra genelor ARN mitocondrial, manifestat prin supresie fenotipică. Genele pentru ARNr 16 S, 23 S, ARN 5 S și ARNt se află în copie unică. Genele 16 S și 23 S sînt lincate dar între ele se interpune gena H_2 pentru ARNt mitocondrial. Celelalte gene sînt distribuite în tot genomul. Genele ribozomale sînt dispuse pe catena grea la capătul terminus al repliconului mitocondrial, gena pentru ARN 21—23 S fiind lincată cu markerii rezistenței la eritromicină și cloramfenicol.

Au fost localizate de asemenea genele pentru proteinele mitocondriale ce intră în structura citocromoxidazelor-cya 1, cya 2 și cya 3, ATP-azei mitocondriale sensibilă la oligomicină, apoi gena pentru citocromul b (cyb 1, ana 1) etc. Recent, a fost chiar sintetizată o oligonucleotidă din secvența genei pentru citocromul c de drojdie (Gillham și colab., 1977).

6. *Expresia genică, transcrierea și traducerea mitocondrială.* Biogeneza mitocondriilor este rezultatul interferenței controlului genic nuclear și al celui mitocondrial.

Deși structura specifică a ADNmt, reprezentată de secvența sa polinucleotidică, este exclusiv guvernată de ADNmt preexistent, funcționarea acestui ADNmt este probabil în mare măsură controlată de gene nucleare. Se admite, fără a fi direct dovedit, că echipamentul enzimatic de bază care intervine în replicarea și transcrierea ADNmt este specificat de gene nucleare. Această supoziție se bazează pe constatarea că variatele tulpini petite de drojdie care conțin diferite deleții ale unor părți mari din ADNmt pot să-și replice și transcrie ADN rămas.

La *Tetrahymena*, și este de presupus că și la alte organisme, există două tipuri de ADN-polimeraze, una pentru ADN nuclear, alta pentru ADNmt. Această ADN-polimerază mitocondrială este specificată de ADN nuclear, fapt demonstrat prin experiențe cu etidium bromidă care blochează activitatea ADNmt, dar nu și pe aceea a ADN nuclear. În cadrul acestor experiențe se constată că sinteza

Scanned with OKEN Scanner

ADN-polimerazei mitocondriale este neafectată, dacă nu chiar mărită.

Ribozomii mitocondriali (foto XXII) constau din două subunități, fiecare conținînd ARNr și un număr mare de proteine ribozomale. Sînt multe dovezi în sprijinul ipotezei că genele pentru ARNr mitocondrial sînt localizate în genomul mitocondrial. Dacă la bacterii sînt circa 6 seturi de gene ARNr, iar celulele eucariote prezintă în nuclee mai multe sute de seturi pentru genele ARNr citoplasmatic, genomul mitocondrial nu conține decît o pereche de gene pentru ARNr mitocondrial. La *Xenopus* și celulele HeLa unde aceste gene sînt strîns lincate, în spațiul dintre ele există un sit ce codifică un

Foto XXII A — **Mitocondrie de Euglena** în care se remarcă o numeroasă populație de ribozomi intramitocondriali (după Leedale, din Stanier și colab., 1970) × 59 500. B — **Secțiune ultrafină prin mitocondrii izolate de** *Candida utilis*, **în care se remarcă ribozomi mitocondriali (mr) aranjați în polizomi** (după Beale și Knowles, 1978).

Scanned with OKEN Scanner

ARN de tip 4 S. Nu se știe încă dacă acest sit este analog celui pentru gena ce specifică ARNr 5 S de la bacterii, cloroplaste sau nucleele eucariotice. Cele peste 50 de proteine ribozomale mitocondriale sînt, după toate probabilitățile, codificate de gene nucleare, sintetizate pe ribozomi citoplasmatici și apoi transferate în mitocondrii, unde se unesc cu ARNr spre a da ribozomi mitocondriali. Sinteza lor nu este blocată de cloramfenicol, dar este blocată de cicloheximidă și anisomicină (inhibitor specific al ribozomilor citoplasmatici), ceea ce atestă localizarea acesteia pe ribozomi citoplasmatici. Dar și în acest caz, sînt unele neconcordanțe alimentate de experiențe la *Paramecium aurelia* la care între diferitele tipuri (singene) apar diferențe în proteinele ribozomale mitocondriale detectate pe cale imunologică și care sînt specificate de ADNmt.

Ribozomii mitocondriali (mitoribozomii) ai metazoarelor sînt mai mici decît cei din citoplasmă sau chiar față de cei de tip procariot, din care cauză aceștia au fost numiți miniribozomi. La *Euglena* și fungi mitoribozomii prezintă o constantă de sedimentare de 70—74 S, pe cînd la mamifere au 55 — 60 S. La ciliate și posibil la plantele superioare aceștia sînt de tip 80 S. După sensibilitatea la antibiotice se aseamănă cu ribozomii bacterieni, deoarece sinteza proteinică la nivelul lor este inhibată de către cloramfenicol sau eritromicină, dar nu și de cicloheximidă. ARN ribozomal mitocondrial nu prezintă omologie de secvență cu ARNr citoplasmatic al aceleiași specii (Dawid, 1972).

ARNr mitocondrial este de tip AU și este transcris sub forma unui precursor cu GM mare (2,4 megadaltoni la *Neurospora*) care apoi este disociat în cele două tipuri mature de ARNr (0,72 și respectiv 1,28 megadaltoni). La mutanta poky de *Neurospora* predomină cantitativ ARNr 23 S, avînd mai puține baze modificate decît ARNr citoplasmatic. ARNr mitocondrial de la metazoare prezintă cele mai mici dimensiuni dintre toate tipurile de ARNr din natură (12 — 13 S și respectiv 16 — 21 S). La fungi și antofite ARNr mitocondrial este de tip procariot, dar cu constanta de sedimentare mai mare față de cel de la *E. coli*.

Ribozomii mitocondriali (foto XXII) apar în electronografii atașați la membrana internă mitocondrială sau se află în interiorul matrixului, adesea grupați în polizomi. Ei nu au proteine ribozomale comune cu cei din citoplasmă. ARNr mitocondrial se sintetizează cu intensitate uniformă în tot ciclul celular (fig. 48).

În transcriere intervine un singur tip de ARN-polimerază mitocondrială sensibilă la rifampicină și rezistentă la α-amanitină. La drojdie se vorbește de două tipuri de ARN-polimerază mitocondrială (Chambon, 1974). ARN-polimeraza mitocondrială (GM = 64 — 74 000 daltoni) este o monopeptidă. Mutanții „petite" au ARN-polimerază funcțională, deși au pierdut cea mai mare parte din ADNmt. Ca ur-

Scanned with OKEN Scanner

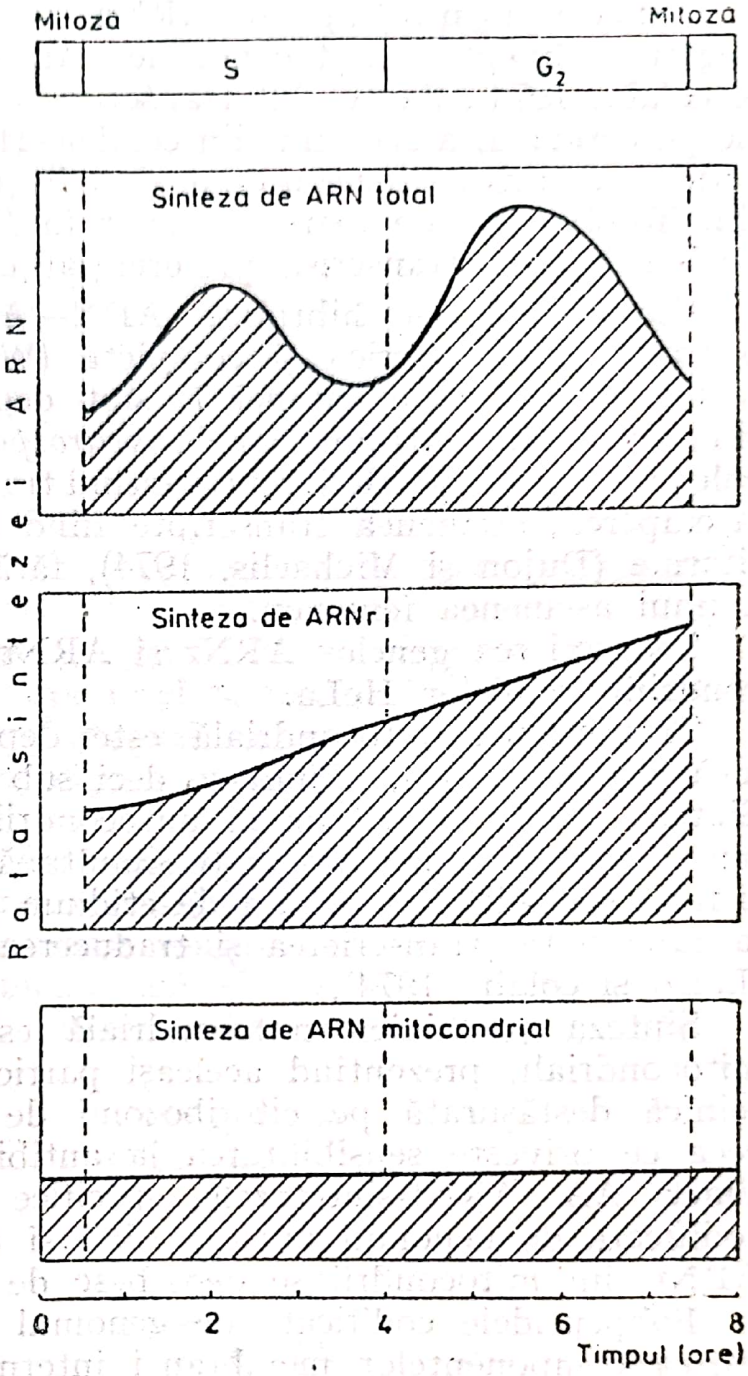


Fig. 48. **Rata sintezei diferitelor tipuri de ARN în timpul ciclului mitotic la Physarum** (redat după Braun şi colab., 1977).

mare s-a conchis că enzima este specificată de genomul nuclear. Transcrierea ADNmt este astfel asigurată de enzime specificate de ADN nuclear.

Sînt 16 — 40 tipuri de ARNt mitocondriali, incluzînd şi forme izoacceptoare. Ele sînt codificate de ADNmt cu excepţia unora dintre tipurile de ARNt de la *Tetrahymena* la care ar fi implicat un control nuclear. În sinteza proteinică mitocondrială multe tipuri de ARNt pot fi importate din citoplasmă, fiind specificate de genomul nuclear. ARNt mitocondriali sînt de asemenea de tip AU, cu o GM = 19 000 daltoni, mult mai mici decît cei citoplasmatici (GM = = 26 000 daltoni) din care cauză au fost numiţi mini-ARNt.

Scanned with OKEN Scanner

Sînt cel puțin 8 tipuri de ARNm mitocondrial purtători de mesaj pentru polipeptide mitocondriale. Au segmente poli (A) (Attardi și colab., 1974). Șapte sînt transcriși de pe catena H iar al optulea de pe catena L a ADNmt din celulele HeLa, fiind vorba de o transcriere precumpănitoare a catenei grele (Gauze, 1977), dar la ADNmt din fibroblastele de șoarece, clonat în *E. coli* cu ajutorul plasmidei pSC 101, este transcrisă preferențial catena L.

Experiențele de hibridare ADN—ARN evidențiază în general o transcriere simetrică și completă (Wood și Luck, 1969) dar, de regulă transcriptele catenei L sînt degradate. În celule HeLa ca și la un mutant extranuclear de *Neurospora* au fost evidențiate molecule precursoare de ARN, reprezentînd transcriptul integral al ADNmt, la ciupercă, asemenea transcripte fiind înglobate în particule virusiforme (Dujon și Michaelis, 1974), fără a se ști semnificația clară a unui asemenea fenomen.

Transcrierea genelor ARNr și ARNt se face coordonat în mitocondriile celulelor HeLa.

Transcrierea mitocondrială este dependentă de sinteza proteinică citoplasmatică, aflîndu-se deci sub un anumit control nuclear. Sinteza ARNr și ARNm în mitocondrii, spre deosebire de sinteza nucleară corespunzătoare, este simultană, continuînd și în metafază și fiind sensibilă la bromura de etidium (Wintersberger, 1973.) Ca și la procariote, transcrierea și traducerea mitocondrială sînt cuplate (Laird și colab., 1974).

Sinteza proteinică mitocondrială este desfășurată pe ribozomi mitocondriali, prezentînd aceleași particularități ca și sinteza proteinică desfășurată pe citoribozomi de tip procariot (mai ales în ceea ce privește sensibilitatea la antibiotice și inițierea cu ARNt Fmet) AA—ARNt-sintetazele, specifice ARNt mitocondriali, sînt codificate de genomul nuclear (Söll și Shimmel, 1974). Tipurile de ARNt din mitocondrii se deosebesc de cele citoplasmatice.

Polipeptidele codificate de genomul mitocondrial intră în alcătuirea componentelor membranei interne mitocondriale ca în citocromoxidază, 4 în ATP-aza mitocondrială și una în citocromul b). Una din proteinele ribozomilor mitocondriali de drojdie și *Neurospora* este posibil codificată de ADNmt, căci mutația genei care o specifică determină fenotipul „poky" și posibil „petite". Genomul mitocondrial mai codifică proteine implicate în controlul ratei de creștere a organitului, al conținutului de citocrom c și a + a_2 și de citocrom b din membrana internă a mitocondriei. Se consideră că enzimele solubile din matrixul mitocondrial sînt codificate de gene nucleare și traduse pe ribozomi citoplasmatici, deși datele genetice disponibile sînt puține. Variantele malatdehidrogenazei mitocondriale (MDH) prezintă ereditate mendeliană și deci sînt controlate de genomul nuclear. Asemenea control a fost dovedit și în cazul

Scanned with OKEN Scanner

izocitrat dehidrogenazei și β-hidroxibutirat dehidrogenazei. În unii hibrizi celulari om-șoarece, din care cromozomii umani sînt eliminați progresiv, păstrîndu-se doar foarte puțini, pe cînd ADNmt este complet pierdut, formele umane ale enzimelor mitocondriale citrat-sintetaza și malat-dehidrogenaza sînt prezente dacă în acești hibrizi este păstrat cromozomul uman 7. Rezultă că în cazul acestor enzime mitocondriale, controlul nuclear este pe deplin dovedit. Tot pe această cale a fost dovedit controlul nuclear al enzimelor mitocondriale izocitrat-dehidrogenaza și fumarat-hidrataza (Bruns și colab., 1976). Sinteza citocromului c este în întregime controlată de genomul nuclear, fapt dovedit și de existența acesteia la drojdiile „petite" în cantitate aproape normală, chiar dacă acestea sînt lipsite de ribozomi mitocondriali și nu pot desfășura sinteză proteinică mitocondrială. În plus, drojdiile normale sintetizează citocromul c chiar în prezența inhibitorilor sintezei proteinice mitocondriale.

Dintre proteinele membranei interne mitocondriale, situl principal al proceselor respiratorii care implică reacții biochimice foarte complexe se află cel puțin în parte sub controlul genomului mitocondrial, complexul ATP-azic oligomicino-sensibil, complexul citocromoxidazei și citocromul b.

Complexul ATP-azic (fig. 49) constă din trei părți: ATP-aza F_1 — partea unității catalitice alcătuită din 5 polipeptide; proteina OSCP — monopeptidă care conferă sensibilitate la oligomicină și care leagă F_1 la fracțiunea de membrană, și fracțiunea de membrană internă tetrapeptidică, a cărei acțiune enzimatică nu este cunoscută.

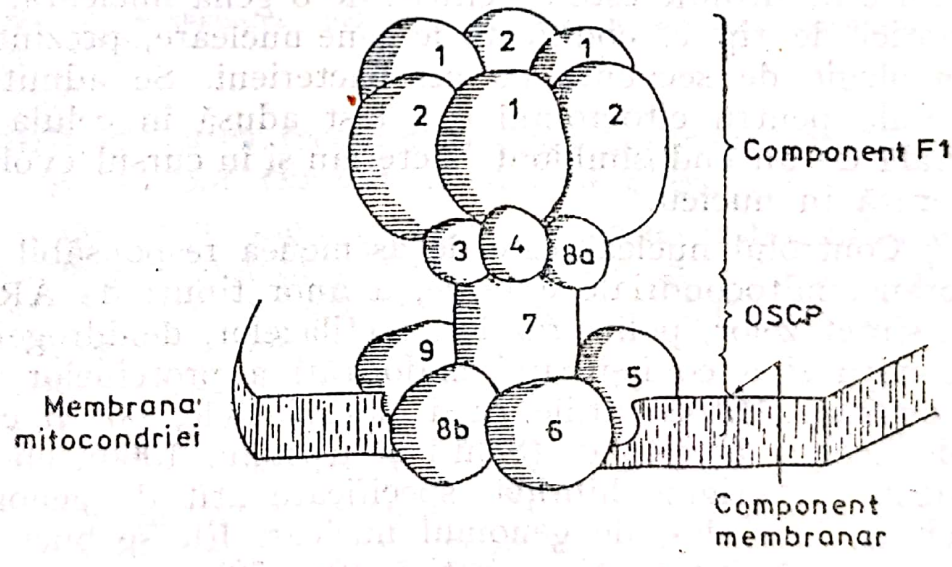


Fig. 49. **ATP-aza mitocondrială.** Se reprezintă localizarea probabilă a nouă subunități în complexul ATP-azic. Subunitățile 1, 2, 3, 4, 7 și 8a sînt sintetizate pe ribozomi citoplasmatici și sînt probabil codificate de ADN nuclear. Subunitățile 5, 6, 8b și 9 sînt sintetizate pe ribozomi mitocondriali și sînt probabil codificate de ADN mitocondrial. Aceste subunități mitocondriale sînt intim asociate cu membranele interne mitocondriale (după Beale și Knowless, 1978).

Scanned with OKEN Scanner

Subunitățile 1 — 4, 7 și 8 a ale ATP-azei mitocondriale sînt codificate de ADN nuclear și sintetizate pe ribozomi citoplasmatici, pe cînd subunitățile 5, 6, 8 b și 9 sînt codificate, cel puțin în parte, de ADNmt și sînt sintetizate pe ribozomi mitocondriali. Aceste subunități ale ATP-azei mitocondriale sînt intim asociate cu membrana internă mitocondrială. Complexul citocrom-oxidază cuprinde 7 polipeptide, dintre care trei mai mari sînt sintetizate pe ribozomi mitocondriali, pe cînd alte trei mai mici sînt sintetizate pe ribozomi citoplasmatici. Sînt însă și unele mutante nucleare (pet) care condiționează pierderea uneia sau a mai multor polipeptide sintetizate în mitocondrii.

Citocromul b cuprinde un grup hem și 2 polipeptide de dimensiuni aproape egale. Cel puțin una din aceste polipeptide se sintetizează pe ribozomii mitocondriali, fapt dovedit de experiențe de inhibiție cu cloramfenicol și cicloheximidă efectuate la *Neurospora.*

După Küntzel și colab. (1973, 1974), există o genă mitocondrială ce specifică o proteină reglatoare care este exportată în nucleu unde controlează gene care specifică enzimele mitocondriale. Aceste gene nucleare pot funcționa numai cînd sînt blocate genele proteinei reglatoare din mitocondrii (fig. 50).

Cel puțin 6 gene mitocondriale codifică subunități lipofilice ale complexelor membranei interne (ATP-aza, coenzima QH_2, citocrom C-reductaza, citocrom b și citocrom C-oxidaza (Küntzel, 1977). Izozimele mitocondriale majore ale malatdehidrogenazei la *Zea mays* sînt codificate de 4 gene nucleare (Yang și colab., 1977). Citocromul c de drojdie este specificat de o genă nucleară. Citocromii eucariotici de tip c, codificați de gene nucleare, prezintă o remarcabilă omologie de secvență cu cei bacterieni. Se admite că gena structurală pentru citocromul c a fost adusă în celula eucariotă ancestrală de un endosimbiont bacterian și în cursul evoluției a fost transferată în nucleu.

Controlul nuclear este de asemenea responsabil de sinteza membranei mitocondriale externe, a unor tipuri de ARNt mitocondrial, a sintetazelor, polimerazelor, metilazelor, dehidrogenazelor din mitocondrii și a covîrșitoarei majorități a proteinelor ribozomale mitocondriale. Mitocondriile, ca și cloroplastele, pot fi considerate un fel de „celule în celulă" (Schiff și Epstein, 1966), ele prezintă componente de origine hibridă, specificate atît de genomul mitocondrial cît și, mai ales, de genomul nuclear. Ele se bucură deci numai de o relativă autonomie genetică (fig. 50).

În concluzie, genomul mitocondrial specifică în exclusivitate structura polinucleotidică a ADNmt și ARNr mitocondrial.

Genomul nuclear specifică în exclusivitate enzimele solubile din matrixul mitocondrial, sau aproape în exclusivitate aparatul enzi-

Scanned with OKEN Scanner

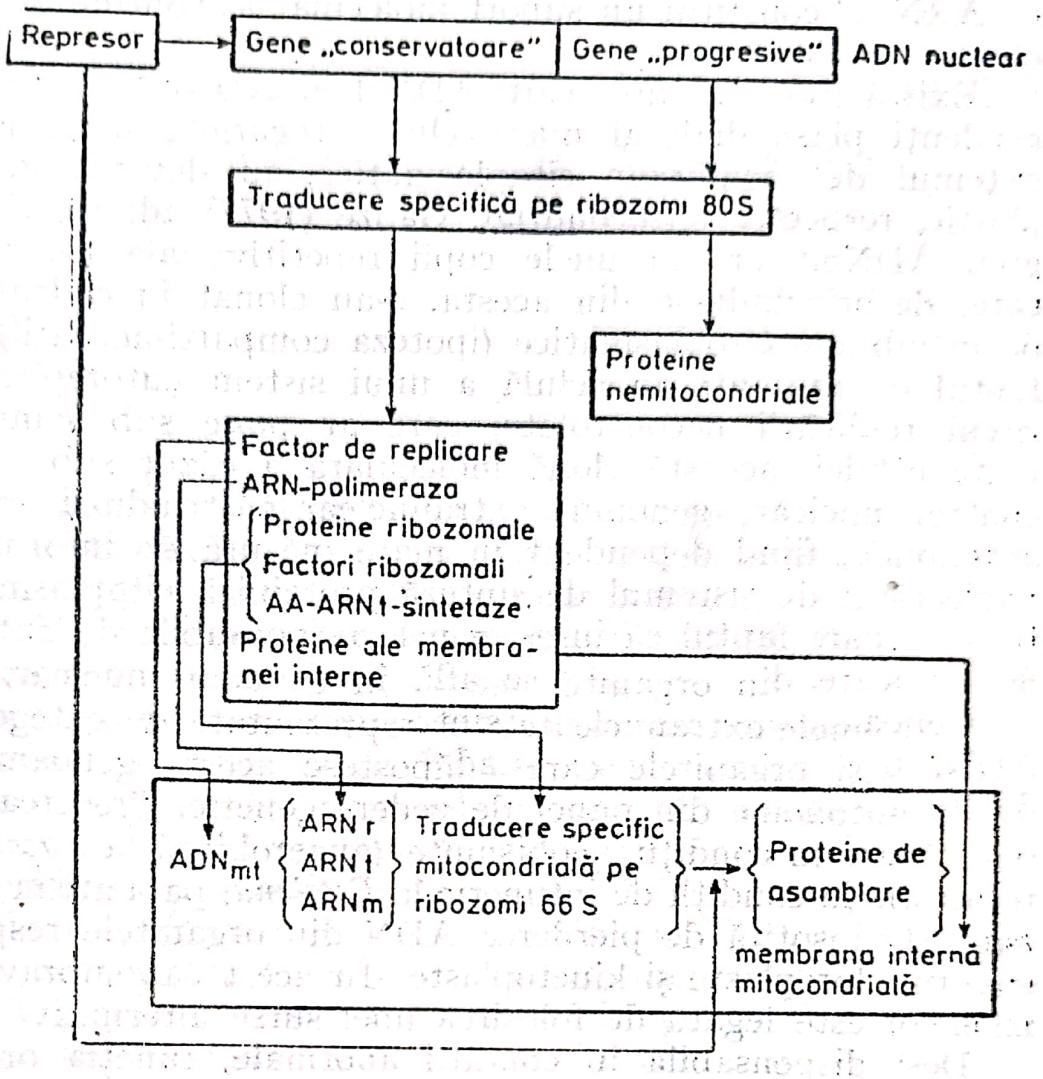


Fig. 50. **Interdependența dintre genomul nuclear și genomul mitocondrial** (modificat după Küntzel și colab., 1973).

matic care controlează replicarea, recombinarea și transcrierea ADNmt, precum și sinteza proteinelor ribozomale și unii citocromi.

Toate celelalte componente ale structurii și funcției mitocondriale sînt rezultatul unui dublu control genomic, nuclear și mitocondrial. Este vorba de diferitele tipuri de ARNt mitocondrial, ATP-aza mitocondrială, citocromoxidaza și citocromul b.

Particularitățile de organizare și funcționare a genomului extranuclear au făcut să fie reluată ipoteza clasică a originii endosimbiotice a organitelor celulei eucariote, în speță a cloroplastelor și a mitocondriilor. Deși multe argumente de ordin biochimic și genetic vin în sprijinul acestei ipoteze (Gavrilă, 1978), ea nu poate explica marele hiatus evolutiv dintre organizarea genetică procariotă și cea eucariotă, cel mai mare hiatus care există actualmente în lumea vie. Constatîndu-se că toate moleculele de ARN 5 S la procariote și eucariote (incluzînd și cele din cloroplaste și mitocondrii) au o lungime constantă de circa 120 nucleotide, s-a admis că acest tip

Scanned with OKEN Scanner

de ARN ar constitui un suport molecular al continuității dintre procariote și eucariote.

Există ipoteza după care ADNcl și ADNmt ar reprezenta descendenți plasmidiali ai unei celule procariote care, înconjurați de sistemul de membrane citoplasmatice, au devenit genomul cloroplastic, respectiv mitocondrial. Gauze (1977) admite că la baza originii ADNmt ar sta unele copii repetitive ale genomului nuclear care, desprinzîndu-se din acesta, s-au clonat în cadrul unui sistem de membrane citoplasmatice (ipoteza compartimentării) și, dat fiind faptul că prezența în celulă a unui sistem autoreplicativ prezintă riscul replicării necontrolate, care ar pune sub semnul întrebării viața celulei, această clonă moleculară a căzut sub incidența unui control nuclear, genomul extranuclear păstrîndu-și doar o limitată autonomie, fiind dependent în mare măsură de informația genetică nucleară și de sistemul de sinteză proteinică citoplasmatică. Semnificativ apare faptul că înseși genele responsabile de sinteza enzimelor de replicare din organite se află în genomul nuclear.

Genoamele extranucleare sînt reprezentate de categorii unice de ADN, deși organitele care adăpostesc aceste genoame nu sînt pe deplin autonome din punct de vedere genetic. Trecerea organismelor unicelulare în condiții neobișnuite (anaerobioză la *Saccharomyces*, heterotrofie în condiții de întuneric la *Euglena*, parazitism la *Trypanosoma*) este însoțită de pierderea ADN din organitele respective: mitocondrii, cloroplaste și kinetoplaste. În acest caz supraviețuirea organismelor este legată de folosirea unei surse alternative de energie.

Deși dispensabilă în condiții anormale, funcția organitelor este esențială în condițiile normale, la care organismele s-au adaptat în decursul unei lungi evoluții.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul VIII

SINTEZA LANȚURILOR POLIPEPTIDICE. ETAPA DE TRADUCERE A INFORMAȚIEI ÎN EXPRESIA GENICĂ

În conformitate cu trăsăturile comune ale macromoleculelor informaționale, potrivit cărora sinteza acestora se desfășoară după planuri analoage de organizare (cap. II), sinteza lanțurilor polipeptidice necesită existența unui complex de compuși preformați și se dezvoltă în patru etape succesive: activarea aminoacizilor, inițierea, elongația și terminarea. Compușii preformați necesari desfășurării celor patru etape sînt numeroși și se împart în următoarele categorii: a) ARNm corespunzător lanțului polipeptidic; b) aminoacizii (AA) constituie precursorii micromoleculari din care se sintetizează lanțurile polipeptidice; c) diferitele tipuri de ARNt corespunzătoare la AA diferiți; d) cofactorii energetici, ATP și GTP; e) ribozomii ca suporturi mecano-structurale și organizatorice specifice sintezei lanțurilor polipeptidice; f) factori caracteristici pentru fiecare etapă, participanți în mod catalitic; se împart, la rîndul lor, în: factori de activare (enzime de activare a aminoacizilor), de inițiere, de elongație și de terminare. Cele șase categorii de componente conlucrează ordonat într-o succesiune de interacțiuni din care rezultă lanțurile polipeptidice ca precursori macromoleculari specifici nefinisați ai proteinelor funcționale.

1. **Activarea aminoacizilor și formarea complexelor amino-acil-ARNt (AA-ARNt); AA-ARNt-sintetazele.** În această etapă, AA liberi aflați în celulosol sînt preparați specific și energetic pentru a fi selectiv rînduiți în conformitate cu codonii din ARNm și pentru a avea nivelul energetic necesar formării legăturii peptidice. Reacțiile de activare implică AA liberi, molecule de ATP, ARNt specifici pentru diferiți AA și sînt catalizate de o familie de enzime denumite AA—ARNt-sintetaze datorită funcției lor de a sintetiza complexe specifice AA—ARNt.

1. *AA—ARNt-sintetazele.* Au fost găsite la toate organismele procariote și eucariote cercetate și identificate în constituția virusurilor de la mamifere. La ultimele existența lor se explică prin captarea intracapsidală pasivă în procesul morfopoezei virale și nu reprezintă

Scanned with OKEN Scanner

produsul vreunei gene din genomul viral. Pentru fiecare aminoacid și ARNt corespunzător acestuia există cel puțin o enzimă separată: Ala—ARNt-sintetaza, Ile—ARNt-sintetaza, Val—ARNt-sintetaza. S-a cercetat dacă există mai multe AA—ARNt-sintetaze corespunzătoare aceluiași aminoacil, la același organism. La bacterii toate probele sprijină conceptul corespondenței biunivoce un aminoacid — o AA—ARNt-sintetază. La eucariote datele sînt în multe privințe neconcludente. De exemplu, la eucariotele superioare (plante și mamifere) s-au descris Leu—ARNt-sintetaze care diferă fizicochimic, sînt produse variabil în raport cu etapele dezvoltării și pot diferi tranzitoriu după administrări hormonale. La fel s-a observat că unele AA—ARNt-sintetaze izolate din mitocondrii diferă de enzimele izolate din citoplasma aceleiași celule.

Greutatea moleculară medie este de aproximativ 100 000 daltoni cu variații considerabile de la o enzimă la alta, între 46 000 și 180 000 daltoni. Referitor la numărul de polipeptide (subunități), enzimele pot fi monomere (Ile—ARNt-sintetaza, Val—ARNt-sintetaza, Tyr—ARNt-sintetaza), dimere (Glu—ARNt-sintetaza de *E. coli*) sau tetramere (Phe—ARNt-sintetaza, Gly—ARNt-sintetaza de la *E. coli*). Enzimele dimere și tetramere pot fi formate din subunități identice (de exemplu, Phe—ARNt-sintetaza de *E. coli* este formată din patru subunități de același fel cu greutatea moleculară de 44 000 daltoni), sau din subunități neidentice, cum este cazul Phe—ARNt-sintetazei de la levuri, formată din două lanțuri polipeptidice, α și β, neidentice care se agregă într-un tetramer $\alpha_2\beta_2$. Compoziția în aminoacizi variază considerabil fie de la un tip de AA—ARNt-sintetază la altul, fie în cadrul aceluiași tip, în raport cu gruparea taxonomică de proveniență.

Fiecare AA—ARNt-sintetază are trei situri active: un sit pentru ATP, comun tuturor tipurilor de enzimă; un sit specific pentru AA; un sit specific pentru ARNt corespunzător AA.

2. *Activarea aminoacizilor și formarea complexelor AA—ARNt; rolul esențial al AA—ARNt-sintetazelor în traducere.* Formarea complexelor AA—ARNt este o reacție de aminoacilare și decurge în două etape: 1) enzima leagă mai întîi ATP și AA în siturile corespunzătoare, catalizînd o reacție de esterificare a grupării carboxil la nivelul restului fosforic α din ATP mai sărac în electroni. Se formează un complex AA—AMP după următoarea reacție:

$$AA + ATP + Enz. \rightarrow AA—AMP\text{-}Enz. + Pirofosfat,$$

stabilindu-se o legătură macroergică între carbonilul aminoacilului și restul fosforic al AMP, legătură care-i imprimă aminoacilului din complexul AA—AMP un nivel ridicat de reactivitate, motiv pentru care reacția se numește activarea aminoacidului; 2) enzima păs-

Scanned with OKEN Scanner

trează compusul AA—AMP, leagă selectiv ARNt corespunzător captat din amestecul celulosolului și catalizează un atac nucleofilic al oxidrilului 2′ din restul adenilic 3′ terminal, asupra legăturii carbonil-fosforice din complexul AA—AMP, conform reacției:

$$\text{AA—AMP—Enz.} + \text{ARNt} \rightarrow \text{AA—ARNt} + \text{Enz.} + \text{AMP.}$$

Se formează o legătură între aminoacil și ARNt corespunzător, a cărei valoare este tot macroergică, deoarece are un potențial energetic de 7,0 Kcal mol^{-1}, apropiat celui înmagazinat într-o legătură activată din ATP. Pirofosfatul eliberat din prima reacție este descompus de o pirofosfatază de asociere în fosfat anorganic cu eliberare de energie folosită atît în formarea complexului AA—ARNt, cît și în schimbările conformaționale ale enzimei specifice, schimbări care permit eliberarea complexului AA—ARNt în celulosolul înconjurător.

Restul aminoacil este legat de molecula ARNt specifică la nivelul sitului de aminoacil, adică la nivelul extremității 3′ cu secvența nucleotidică 5′pCpCpA—3′. După cum s-a menționat mai sus, aminoacilul este legat în poziția 2′ a extremității adenilice și nu în poziția 3′, cum se credea. Sprinzl și colab. (1973) au observat că un $ARNt^{Phe}$ (ARNt pentru fenilalanină) la care s-a eliminat oxidrilul 3′ din adenilul terminal este capabil să lege fenilalanină, pe cînd adenilul terminal cu oxidril 3′, dar fără oxidril în poziția 2′ nu mai poate forma complexul specific AA—ARNt. Deși această structură, ilustrată în fig. 51, nu a fost demonstrată la toate complexele AA—

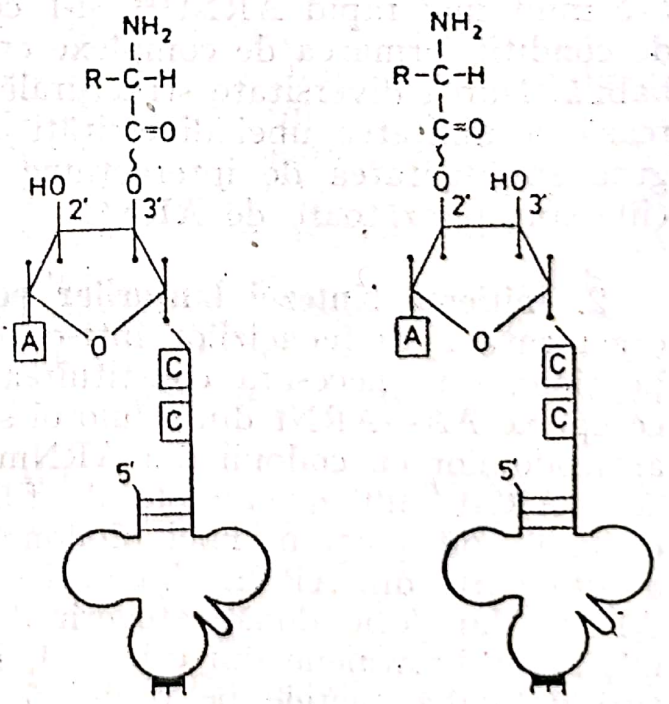


Fig. 51. Modul de legare a restului aminoacil la extremitatea 3′ a ARNt în alcătuirea complexului AA—ARNt. În stînga este schematizată legarea în poziția 3′ a adenozilului terminal iar în dreapta legarea în poziția 2′.

ARNt, dovezile prezente sînt destul de fundamentate pentru legarea aminoacilului în poziţia 2′ şi nu în 3′. Activarea AA şi formarea complexelor AA—ARNt se dezvoltă cu fiecare AA în parte şi are ca rezultat un amestec de toate tipurile de AA—ARNt care se găsesc liberi în celulosol.

Specificitatea de interacţiune a AA—ARNt-sintetazei cu AA, pe de o parte, şi cu ARNt corespunzător, pe de altă parte, constituie prima treaptă a specificării AA în procesul complex al traducerii. Fidelitatea cu care fiecare aminoacid este încorporat într-o secvenţă peptidică specifică în etapele ulterioare ale traducerii este dependentă de activităţile specifice ale diferitelor AA—ARNt-sintetaze. Diferite metode de studiu al interrelaţiei dintre enzimă şi ARNt sugerează că recunoaşterea se bazează pe interacţiunea dintre situl specific al enzimei şi următoarele segmente ale ARNt: bucla dihidrouridinică, bucla anticodon şi extremitatea 3′. Primele două constituie situl specific de recunoaştere. Formarea complexelor neeronate, „corecte", de AA—ARNt nu este realizată simplist numai prin specificitatea de legare, ci şi prin viteza mai mare a aminoacilării corecte, cît şi prin raporturile de interconectare reacţională în care enzimele se află *in vivo*. În condiţiile din celulosol AA—ARNt-sintetazele recunosc şi leagă simultan moleculele de ARNt aflate în amestec. În acest context asocierile enzimă-ARNt potrivite au loc la nivelul cel mai înalt iar asocierile eronate sînt făcute reciproc improbabile prin înseşi enzimele specifice aflate concomitent în acţiune. De exemplu, de ce Ile—ARNt-sintetaza aflată *in vivo* ar asocia $ARNt^{Phe}$ cînd există $ARNt^{Ile}$ cu care se asociază de o sută de ori mai rapid şi totodată există Phe—ARNt-sintetaza care asociază mult mai rapid $ARNt^{Phe}$ şi-l consumă la concurenţă. În astfel de condiţii formarea de complexe eronate AA—ARNt devine improbabilă. Marea diversitate structurală a AA—ARNt-sintetazelor sugerează posibilitatea unei diversităţi a mecanismelor prin care se asigură specificitatea de interacţiune cu aminoacizii eterogeni şi speciile corespunzătoare de ARNt.

2. **Iniţierea sintezei lanţurilor polipeptidice.** Pentru încorporarea organizată a aminoacizilor într-o secvenţă specifică unui lanţ polipeptidic, este necesară constituirea unui agregat în care diferitele complexe AA—ARNt din celulosol să interacţioneze prin intermediul anticodonilor cu codonii din ARNm. Atît ARNm, cît şi complexele AA—ARNt sînt macromolecule filiforme în care codonul şi anticodonul sînt porţiuni mici. Codonul în general reprezintă cel mult a suta parte din ARNm, iar anticodonul, cam a treizecea parte din ARNt. Cum cele două categorii de molecule filiforme sînt expuse mişcărilor browniene din celulosol, interacţiunea specifică prin legături de slabă energie pe întinderi aşa de mici este practic imposi-

Scanned with OKEN Scanner

bilă în condițiile mișcărilor libere. Asigurarea stabilității celor două macromolecule, cît și orientarea lor în configurații spațiale favorizante pentru interacțiuni specifice sînt date de ribozom care se complexează cu ARNm la nivelul unor situri specifice și formează un agregat capabil să atașeze complexul AA—ARNt. Formarea primului agregat tripartit ARNm-ribozom-AA.-ARNt necesar în sinteza unui lanț polipeptidic se numește inițiere iar agregatul format se numește complex inițiator. Pentru formarea complexului inițiator este necesară o mare specificitate privind segmentul de ARNm incriminat în proces, siturile ribozomice care participă direct în interacțiune, tipul de AA—ARNt și factori specializați inițierii.

1. *Codonul inițiator la procariote și eucariote: situl de inițiere din molecula de ARNm.* Se înțelege prin codon inițiator tripleta de ribonucleotide din ARNm care participă la alcătuirea sitului de interacțiune a mesagerului cu ribozomul, cu complexul AA—ARNt inițiator și cu factorii inițiatori. Codonul inițiator este constituit din tripleta 5′—AUG—3′ care specifică încorporarea metioninei (cap. I). Observațiile care au condus la această aserțiune sînt următoarele:

1) Determinările aminoacidului care constituie extremitatea aminoterminală a lanțurilor polipeptidice sintetizate sau pe cale de sinteză. Din lucrările de pionierat cunoscîndu-se că sinteza unui lanț polipeptidic începe cu extremitatea aminoterminală, atunci s-a raționat că aminoacilul de la această extremitate indică tripleta codonului de inițiere. La bacterii s-a observat că peste 40% din lanțurile polipeptidice sintetizate au ca extremitate amino restul metionil. Ulterior, tot la bacterii s-a constatat că și celelalte lanțuri polipeptidice au inițial fie metionil, fie N-formil-metionil la extremitatea amino, resturi aminoacil eliminate ulterior sintezei. Aceste fapte sugerau că primul codon participant în inițiere este codonul metioninic. La eucariote s-a observat însă că un număr foarte restrîns de polipeptide au ca prim aminoacil metionilul. Natura diversă a extremității amino punea sub semnul întrebării unicitatea codonului inițiator, dar Wilson și Dintzis în 1970 au observat că primul aminoacid încorporat în sinteza lanțului β al hemoglobinei este tot metionina care este apoi scindată de timpuriu cînd lanțul polipeptidic născînd nu are mai mult de 20 de aminoacili. Această constatare cît și altele au indicat codonul metioninic AUG drept codon inițiator;

2) Studiile secvențelor nucleotidice ale diferiților ARNm de la procariote și eucariote au confirmat natura unică a codonului inițiator ca fiind AUG. Datele experimentale obținute *in vitro* cu ajutorul poliribonucleotizilor sintetici au indicat că și codonii GUG și GUA pot iniția sinteza de polipeptide, dar în sintezele naturale numai codonul AUG poate fi inițiator. Tot cu ajutorul poliribonucleotizilor

Scanned with OKEN Scanner

sintetici s-a observat că formarea complexului de inițiere are loc la extremitatea 5′ a mesagerului iar citirea se continuă în direcția 5′ → 3′. Deoarece multe lanțuri polipeptidice au restul metionil în diferite poziții distale sau proximale față de extremitatea amino, s-a căutat explicația dualității funcționale a codonului AUG, fie ca inițiator al sintezei, fie ca simplu codon de încorporare aminoacidică. La început s-a emis ipoteza simplă că poziția codonului AUG la extremitatea 5′ îi induce calitatea de inițiator iar poziția internă în secvența codonică a ARNm îl califică drept codon de încorporare. Această ipoteză însă a fost infirmată de determinările secvențelor nucleotidice care au demostrat că în mesagerii naturali codonul AUG inițiator nu se află la extremitatea 5′ a ARNm natural, ci se găsește interiorizat de telosegmente extracodonice (netraductibile).

Determinările secvențelor nucleotidice ale poliribonucleotidelor naturale ale fagilor ARN (Steitz, 1969, Nichols, 1970, Min-Jou și colab., 1972), cît și ale secvențelor nucleotidice ale ARNm β pentru hemoglobina A (Proudfoot și colab., 1974) și pentru lanțul L al imunoglobulinei (Brownlee și colab., 1973, Milstein și colab., 1974) au demonstrat existența unor telosegmente extracodonice netraduse care încadrează segmentul codonic de tradus (fig. 52). Telosegmentele au fost denumite 5′ și 3′ în raport cu poziția lor față de extremitățile segmentului traductibil. Telosegmentul 5′ se continuă cu codonul AUG inițiator din segmentul traductibil. Extremitatea telosegmentului 5′ opusă codonului inițiator, adică extremitatea 5′ terminală, prezintă o modificare demonstrată la multe specii de ARNm provenite de la grupări taxonomice variate (mamifere, plante, virusurile lor). Această modificare constă din prezența unei metil-7-guanozine legate trifosforic —5′.P.P.P.5′ la primul nucleotid al telosegmentului (Proudfoot și Brownlee, 1976) (fig. 52). Restul me-

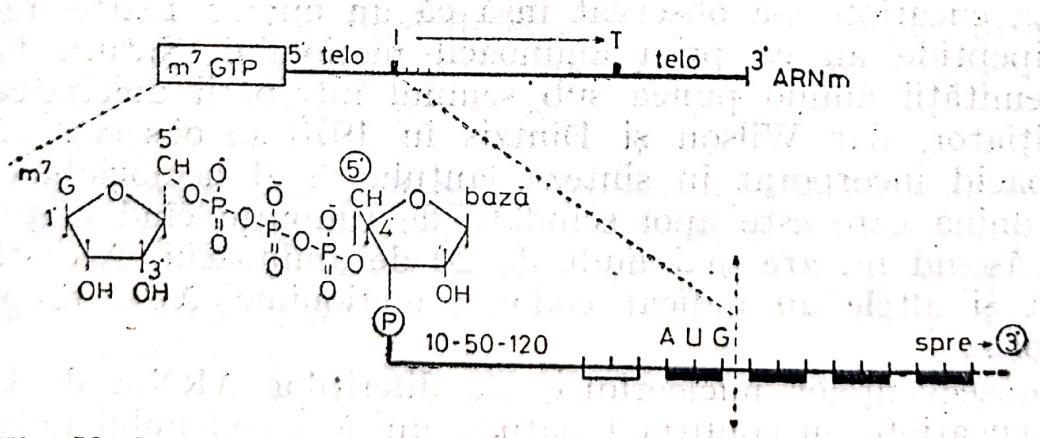


Fig. 52. Situl de inițiere din ARNm. Cifrele 10, 50, 120 semnifică numărul de nucleotidii găsiți în alcătuirea telosegmentului 5′ la diferiți ARNm. Tripleta predecesoare codonului AUG indică locul mutațional descris la ARNm pentru izocitrocomul c de levură Baker. Sus este ilustrat un ARNm cu telosegmentele 5′ și 3′ cît și segmentul traductibil I—T (inițiator-terminator).

til-7-guanilic-5′ terminal nu a fost observat la ARNm bacterian și bacteriofagic (Revel și colab., 1977). Importanța grupării m^7G în structura sitului de inițiere la eucariote a fost dovedită prin inhibiția inițierii cu ajutorul analogilor acestei grupări, de exemplu a 7-metil-GMP. Gruparea metil este esențială pentru funcția grupării 5′ terminale în inițiere. Telosegmentul 5′ procariotic este destul de scurt — are 5 — 7 nucleotidili purinici — și este complementar unei secvențe 3′ terminale din structura ARN 16 S participant la alcătuirea subunității 30 S. Secvența telosegmentului 5′ împreună cu codonul inițiator formează un sit de recunoaștere pentru factorii de inițiere participanți în formarea complexului inițiator. Cu alte cuvinte, situl de inițiere din ARNm nu este constituit numai din codonul AUG, ci și din telosegmentul 5′ care-i imprimă primului calitatea de inițiator. O dovadă în acest sens o constituie comportarea liniei mutante de levură Barker, caracterizată prin alterarea codonului inițiator al ARNm pentru izo-1-citocrom c, leziune mutațională care nu permite inițierea. Din populația mutantă s-a izolat o sublinie care printr-o a doua mutație a produs un codon AUG dintr-o tripletă a telosegmentului 5′ imediat predecesoare codonului inițiator original. Cea de-a doua mutație a permis sinteza unui izo-1-citocrom c modificat, dar cu capacități funcționale supresînd defectul de inițiere indus de prima mutație (Stewart și colab., 1971). Mutațiile care alterează unii codoni din interiorul segmentului traductibil și care produc codoni AUG duc la o substituire de aminoacid (de exemplu, GUG → AUG — Val → Met) și nu dau un sit de inițiere. Ca urmare, situl de inițiere din ARNm este format dintr-un telosegment 5′ netraductibil capabil să interacționeze cu factorii de inițiere și din codonul AUG inițiator adiacent (Ochoa și Mazumder, 1974; Proudfoot și Brownlee, 1976).

2. *ARNt inițiator la procariote și eucariote.* Numeroase cercetări efectuate în sisteme bacteriene au demonstrat existența a două tipuri de ARNt pentru metionină ($ARNt^{Met}$) (Haselkorn și Rothman-Denes, 1973): unul care participă numai în inițiere și altul care încorporează metionina interiorizat și nu la extremitatea amino. Primul a fost numit ARNt-inițiator. Acesta, după formarea complexului Met-$ARNt^{Met}$, interacționează cu o enzimă care formilează gruparea amino a metionilului din complexul Met-$ARNt^{Met}$. Enzima se numește tetrahidrofolat-formimin Met—$ARNt^{Met}$-transformilaza iar produsul reacției este denumit N-formil-Met-$ARNt^{Met}$. La procariote, acesta este singurul AA-ARNt capabil să participe la formarea complexului de inițiere. Transformilaza nu poate formila $ARNt^{Met}$ de încorporare interiorizată, de aceea cei doi $ARNt^{Met}$ au mai fost simbolizați cu $ARNt_f^{Met}$ (f = formil) și respectiv $ARNt_m^{Met}$ (m=metionină).

La eucariote și implicit la om s-au descris tot două tipuri de $ARNt^{Met}$. Un $ARNt^{Met}$ inițiator al cărui complex cu metionilul nu-i formilat din simplul motiv că eucariotele nu au transformilază în celulosol. Participă în procesul inițierii ca agregat simplu Met-$ARNt^{Met}$ și din aceste motive este denumit $ARNt_i^{Met}$. $ARNt_i^{Met}$ se deosebește de toți ARNt descriși, inclusiv de $ARNt_m^{Met}$ procariotic și eucariotic, prin faptul că în bucla ψ, secvența TψC este înlocuită cu secvența AUC (Piper și Clark, 1974, Simsek și Bhandary, 1974). $ARNt_i^{Met}$ poate fi formilat *in vitro* sub acțiunea transformilazei bacteriene și poate participa la inițierea sintezei de polipeptide în sistemele bacteriene, de aceea este denumit tot $ARNt_f^{Met}$.

La organitele posesoare de ADN extracariotic, ARNt inițiator este asemănător celui bacterian iar complexul Met-$ARNt_f^{Met}$ participă în inițiere după formilare sub acțiunea unei transformilaze proprii acestor organite.

3. *Factorii de inițiere la procariote și eucariote.* Sînt simbolizați cu inițialele IF (engl. = *initiation factor*) și respectiv IF-E (engl.= *initiation factors of eukariotes*). Factorii IF sînt mai bine caracterizați. IF—1 este o proteină bazică de 9400 daltoni, are mai puțin de 90 de aminoacizi în moleculă și se aseamănă cu proteinele ribozomale. IF—2 există în cel puțin două forme: IF—2 a cu greutatea moleculară de 80 000 daltoni și IF—2 b cu greutatea moleculară de 100 000 daltoni. Este indispensabil formării complexului inițiator promovînd legarea ribozomală a complexului f-Met-$ARNt_f^{Met}$. Funcționează catalitic deoarece o molecúlă de IF—2 poate lega mai multe molecule de f-Met-$ARNt_f^{Met}$. Participarea în inițiere este stimulată de IF-1. Necesită GTP ca sursă de energie pentru reciclare catalitică. I se descriu cel puțin cinci situri de asociere: unul pentru f-met-$ARNt_f^{Met}$, unul pentru subunitatea ribozomală 30S, unul pentru GTP, unul pentru IF-1 și unul de interacțiune cu subunitatea 50S. IF-3 este o proteină monomeră cu două forme care diferă prin greutatea moleculară: IF-3α = 21500 daltoni și IF-3 β = 23500 daltoni. Fiecare formă influențează independent disocierea ribozomului 70 S în subunitățile 50 S și 30 S, de aceea mai sînt numiți factori de disociere. Promovează legarea subunității 30 S la ARNm în situl de inițiere al acestuia. În formarea complexului de inițiere este necesar pentru mesagerii naturali, dar nu și pentru cei sintetici (poliribonucleotide artificiale).

La eucariote, factorii de inițiere manifestă diferențe remarcabile ca număr, structură și implicații funcționale în controlul întregului proces de traducere cît și în diferențiere (capitolul X). Sînt descriși cel puțin șase factori de inițiere (Staehelin și colab., 1977). Toți sînt de natură proteinică și prezintă o mare diversitate structu-

Scanned with OKEN Scanner

rală. IF-E1 are greutatea moleculară de 15 000 daltoni și participă ca factor stimulator comun pentru ceilalți factori, fie în legarea Met-ARNt$_f$, fie în întărirea asocierii ARNm. IF—E2 are masa de 130 000 daltoni, este format din trei subunități de 32 000, 47 000 și respectiv 50 000 daltoni; activitatea acestuia este dependentă de GTP. IF—E3 este un complex proteinic mare, format din 9—11 subunități eterogene. Variază uneori ca diversitate de la un țesut la altul la același organism. Sedimentează ultracentrifugal ca o unitate fizică și are o valoare de sedimentare în jurul valorii 17 S. Se comportă asemănător unui organit unitar. IF—E4, IF—E5 și IF—E6 au greutăți moleculare de 50 000, 170 000 și respectiv 80 000 de daltoni. Ca și IF—E1, sînt proteine monomere. IF—E4 și IF—E6 necesită ATP și participă cooperativ și specific la legarea ARNm. IF—E5 catalizează legarea subunității ribozomale 60 S și are drept cofactor energetic GTP pe care îl hidrolizează în GDP + rest fosforic + energie.

4. *Mecanismul formării complexului inițiator la procariote și eucariote.* Deoarece există diferențe în formarea complexului inițiator la procariote și la eucariote, este necesară o descriere separată.

a) *Inițierea la procariote.* Ribozomii 70 S aflați liberi în celulosol disociază conform reacției reversibile:

$$70\ S \rightleftharpoons 50\ S + 30\ S.$$

Factorul IF—3 se atașează de subunitatea 30 S la nivelul proteinei S12 din structura acestuia și nu mai permite reasocierea, ceea ce are ca efect o deplasare a constantei de disociere puternic spre dreapta, mecanism care a determinat ca IF—3 să fie considerat și factor de disociere, deși nu intervine direct în disocierea propriu-zisă (Ochoa și Mazumder, 1974). Urmează în continuare legarea lui IF—2 favorizată de asocierea lui IF—1, ultimul avînd rolul de a promova legarea lui IF—2, astfel se formează un precomplex inițiator (30 S—IF—3—IF—2—IF—1).

Factorul IF—2 din precomplex selectează f—Met—ARNt$_f$ și leagă în același timp GTP. În absența ARNm, asocierea ARNt$_f$ inițiator este foarte instabilă, de aceea aproape simultan ARNm este legat la subunitatea 30 S cu concursul direct al factorului IF—3 și al interacțiunii specifice anticodon (f—Met—ARNt$_f$)-codon AUG inițiator (fig. 53). Ultima reacție face inaptă menținerea lui IF—3 în complex și este eliberat în celulosol, capabil să participe la o altă inițiere. Pînă nu demult se credea că asocierea ARNm precede legarea ARNt$_f$ inițiator, dar în condiții particulare s-a constatat că subunitatea 30 S este capabilă să lege f—Met—ARNt$_f$ în absența ARNm, pe cînd în aceleași condiții nu poate asocia ARNm în absența f—Met—ARNt$_f$ (Gilbert și Kaempfer, 1974). La asocierea ARNm în complexul de inițiere intervin și împerecherile complementare dintre

Scanned with OKEN Scanner

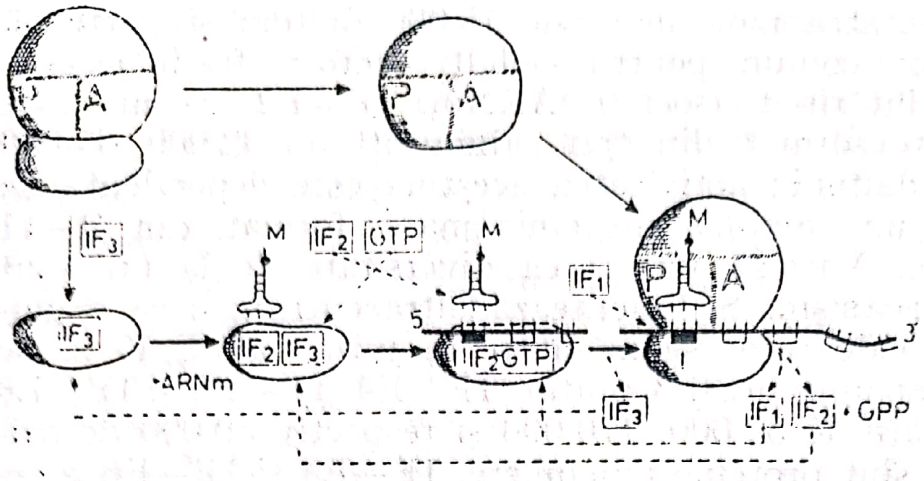


Fig. 53. Ilustrarea procesului de inițiere în sinteza polipeptidelor la procariote. P = = situl peptidil de pe subunitatea 50 S (60 S); A = situl acceptor aflat pe aceeași subunitate.

telosegmentul 5′ și un segment apropiat de extremitatea 3′ a ARNr 16 S din subunitatea 30 S. Această interacțiune este favorizată de proteina ribozomală constitutivă S1 agregată cu extremitatea 3′ a ARNr 16 S.

Complexul (ARNm · 30 S · f — Met — $ARNt_f$ · IF — 2 · GTP · · IF—1), considerat complexul inițiator propriu-zis, prin intermediul funcției multivalente a IF—2 atașează, subunitatea 50 S concomitent cu eliberarea lui IF—1. La nivelul subunității 50 S, f—Met—$ARNt_f$ se atașează sitului P, iar noile schimbări conformaționale declanșează activitatea guanozintrifosfatazică a IF—2. Energia eliberată de reacția GTP → GDP + Pi desprinde acest factor din complex și rezultă agregatul (ARNm · 70 S · f — Met — $ARNt_f$) care este de fapt complexul de elongație (fig. 53).

b) *Inițierea la eucariote.* Numărul mare de factori, eterogenitatea mai mare a proceselor în care sînt antrenate moleculele de ARNm, specializările funcționale diferențiate ale celulelor determină ca formarea complexului inițiator din sinteza citoplasmatică a polipeptidelor să dobîndească un grad superior de interacțiuni. Pentru formarea complexului inițiator participă ca suport subunitatea ribozomală mică 40 S derivată din disocierea spontană a ribozomului 80 S, conform reacției reversibile:

$$80\ S \rightleftharpoons 60\ S + 40\ S.$$

Nu s-a descris vreun factor cu efect de disociere. Probabil că însăși neparticiparea unității 80 S în sinteza polipeptidică o face instabilă și duce la disocierea sa. Înainte de antrenarea subunității 40 S, IF—E2 selectează și se combină cu Met—$ARNt_f$, leagă GTP și formează complexul:

(IF—E2 · GTP · Met—$ARNt_f$)

Scanned with OKEN Scanner

Acest complex este stabil și se obține ușor, deoarece este reținut de filtrele nitrocelulozice. Sub acțiunea stimulatoare a factorului IF—E1, complexul se atașează subunității 40 S și formează, independent de ARNm, următorul precomplex inițiator:

$$(IF—E2 \cdot GTP \cdot Met—ARNt_f \cdot 40\ S \cdot IF—E1).$$

Cu precomplexul inițiator interacționează la un nivel crescut de afinitate IF—E3, a cărui asociere mărește semnificativ stabilitatea legării $Met—ARNt_f$ în situl de atașare de pe subunitatea 40 S. Factorul IF—E3 este facultativ necesar legării $Met—ARNt_f$, dar odată ce acționează o întărește. Urmează atașarea ARNm. Legarea ARNm este cea mai complexă interacțiune, deoarece — pe lîngă necesitatea absolută a lui IF—E3 — îndeplinirea reacției solicită participarea obligatorie a factorilor IF—E4, IF—E6 și a ATP în prezența constantă a factorului IF—E1 stimulator comun atît pentru legarea $MetARNt_f$, cît și pentru asocierea mesagerului. Nu s-a precizat dacă ATP participă ca sursă energetică sau este numai ligand specific inductor de schimbări conformaționale avantajoase interacțiunilor. Din aceste interacțiuni rezultă un agregat stafiliform cu următoarea formulă:

$$ARNm \cdot 40\ S \cdot Met—ARNt_f \cdot IF—E3 \cdot IF—E4 \cdot IF—E6 \cdot ATP \cdot IF—E1.$$

Nu se precizează dacă IF—E2 mai persistă în agregat. Staehelin și colab. (1977) subliniază că ar putea fi implicat și în legarea ARNm. Formarea ultimului complex are semnificație informațională deosebită, deoarece anticodonul $Met—ARNt_f$ inițiator interacționează specific prin împerecheri Watson-Crick cu codonul AUG inițiator din ARNm și contribuie la legarea ARNm într-o configurație potrivită următoarei etape de sinteză a lanțurilor polipeptidice.

Cu toate că la mesagerii eucariotelor s-a descris și caracterizat prezența grupării metil-7-guanozinice legată trifosforic la telosegmentul 5′, deși i s-a dovedit necesitatea în reacția de inițiere, modul de interacțiune încă nu a fost precizat. Ca reacție finală urmează legarea subunității ribozomale mari, 60 S, sub acțiunea catalitică a factorului IF—E5 dependent de GTP. Legarea celui din urmă factor și a unității 60 S declanșează schimbări conformaționale în toată unitatea ribozomală 80 S pe cale de constituire și se produc următoarele modificări: a) $Met—ARNt_f$ se atașează sitului P de pe suprafața subunității 60 S; b) toți ceilalți factori sînt eliberați în mediu; c) IF—E5 dobîndește activitate guanozintrifosfatazică, descompune GTP în GDP și fosfat anorganic și energia eliberată este utilizată atît la formarea unității 80 S, cît și la propria desprindere din complex. Aceste schimbări conduc la formarea agregatului $Met—ARNt_f \cdot 80\ S \cdot ARNm$, care este complexul de elongație. Deși se formează

Scanned with OKEN Scanner

și un complex inițiator Met—ARNt$_f$ · 40 S · ARNm, starea sa este efemeră și încărcată de diferiți factori de inițiere de tip eucariotic.

O caracteristică informațională importantă pentru ambele tipuri de inițieri constă în faptul că în acest caz anticodonul din constituția ARNt inițiator „dictează" fixarea matriței ARNm, deoarece în complexul inițiator este legat întîi Met—ARNt$_f$ și apoi mesagerul. În elongație, contrar inițierii, mesagerul este acela care dictează legarea diferitelor tipuri de AA—ARNt, conform secvenței codonice din segmentul traductor.

Formarea complexului inițiator la eucariote este un consumator energetic superior, deoarece pentru activitatea factorilor de inițiere este necesară arderea metabolică a două molecule de GTP. Pînă nu demult și în cazul eucariotelor se descriau numai 3 factori de inițiere ca și la bacterii. Aceștia erau denumiți M—1, M—2 și M—3 (Ochoa și Mazumder, 1974), simboluri care nu mai sînt utilizate.

Sensul biologic al multitudinii factorilor de inițiere constă din necesitatea de a edifica în mod specific complexul ribozom-ARNm, de a rîndui subunitățile ribozomale și ARNm într-un edificiu apt de a începe sinteza polipeptidului propriu-zis. Încorporarea metionilului în această etapă a inițierii apare ca o probă preliminară că edificiul construit de factorii de inițiere este funcțional, deoarece restul metionil este apoi îndepărtat printr-un mecanism specific de proteoliză exopeptidazică (vezi capitolul următor).

Subunitatea ribozomală mică (fie 30 S, fie 40 S) este o formă globulară ribonucleoproteinică pe suprafața căreia sînt organizate numeroase situri de interacțiune cu factorii de inițiere și trei situri de construcție finală a complexului inițiator și apoi al celui de elongație: situl pentru AA—ARNt inițiator, situl pentru ARNm și situl de atașare a subunității mari (50 S sau 60 S). Cele trei situri sînt energetic necesare, deoarece complexul de inițiere propriu-zis este format din subunitatea ribozomală mică, molecula de AA—ARNt inițiator și molecula de ARNm ulterior atașată prin situl ei de inițiere (fig. 52 și 53). De exemplu, dacă s-ar presupune (așa cum se credea) că AA—ARNt inițiator s-ar atașa numai prin anticodon la codonul AUG din ARNm această împerechere specifică ar fi insuficientă energetic pentru menținerea macromoleculei în complex pînă la atașarea subunității ribozomale mari. În consecință, suportul specific pentru AA—ARNt inițiator este la început un sit caracteristic din suprafața subunității mici. Subunitatea ribozomală mare (fie 50 S, fie 60 S), ultima participantă care încheie procesul de inițiere și formează complexul de elongație, are în principal următoarele situri: situl pentru ARNm și subunitatea 30 S cu o conformație asemănătoare unei caneluri care împreună cu o adîncitură similară de pe suprafața subunității mici alcătuiesc fie o depresiune conjugată, fie un tunel în care se află filamentul de ARNm captat pe o lungime de

Scanned with OKEN Scanner

aproximativ 35 de resturi nucleotidil; situl peptidil (situl P) care după atașare la subunitatea mică preia atașarea AA—ARNt inițiator; acest sit în elongație va atașa și susține steric ARNt-peptidil (ARNt-polipeptidil); situl acceptor sau situl A al cărui rol va fi subliniat în elongație.

3. **Elongația în sinteza lanțurilor polipeptidice sau reacția de polimerizare a aminoacizilor în polipeptide macromoleculare.** Elongația urmează imediat inițierii și constituie etapa propriu-zisă a reacției de polimerizare prin care resturile aminoacil activate sînt încorporate într-un polipeptid specific. Este denumită elongație (engl. *elongation* = alungire, prelungire), deoarece în decursul ei are loc o prelungire progresivă a lanțului polipeptidic născînd prin adăugare ordonată, unul cîte unul, a aminoacizilor constituenți (fig. 54). Încorporarea fiecărui aminoacid în desfășurarea elongației este un proces ciclic format din trei reacții: atașarea complexului AA—ARNt la nivelul sitului acceptor de aminoacizi (situl A) specificată de împerecherea codon-anticodon; sinteza legăturii peptidice; translocația complexului peptidil-ARNt în situl P și mobilizarea ARNm pe suportul ribozomal.

1. *Atașarea complexului AA—ARNt la nivelul sitului acceptor (situl A) specificată de împerecherea codon-anticodon.* În complexul de elongație gata constituit la sfîrșitul inițierii (fig. 53, 54), situl P este ocupat de Met—ARNt^{Met} inițiator împerecheat specific prin anticodonul său cu codonul AUG. Situl A, acceptor de complexe AA—ARNt, este liber și se află în dreptul celui de-al doilea codon din segmentul traductibil al ARNm (fig. 54). În celulosolul înconjurător se află în amestec toate tipurile de AA—ARNt produse prin activitatea AA—ARNt-sintetazelor diverse. Din acest amestec este selectat complexul AA—ARNt al cărui anticodon corespunde, conform complementarității Watson-Crick, codonului din dreptul sitului A. Selecția este concomitentă cu împerecherea specifică anticodon-codon și cu atașarea complexului în situl A din unitatea ribozomală mare (fie 50 S, fie 60 S). Selecția, împerecherea specifică și atașarea în situl A sînt considerate drept un proces de transfer al complexului AA—ARNt din amestecul celulosolului pe complexul de elongație. Dar acest transfer nu se derulează simplu, ci este dependent de factori de elongație cu funcție de transfer, simbolizați cu inițialele EF (engl. *elongation factors*).

La procariote și la organitele cu ADN propriu de la eucariote, s-au descris doi factori de transfer, EF—Tu și EF—Ts. Factorul EF—Tu este de natură proteinică, are greutatea moleculară de 39 000 — 42 000 daltoni, are capacitatea să lege puternic GDP și mai slab GTP. Factorul EF—Ts este tot un monomer proteinic de 19 000 daltoni și are proprietatea de a se agrega cu factorul EF—Tu.

Scanned with OKEN Scanner

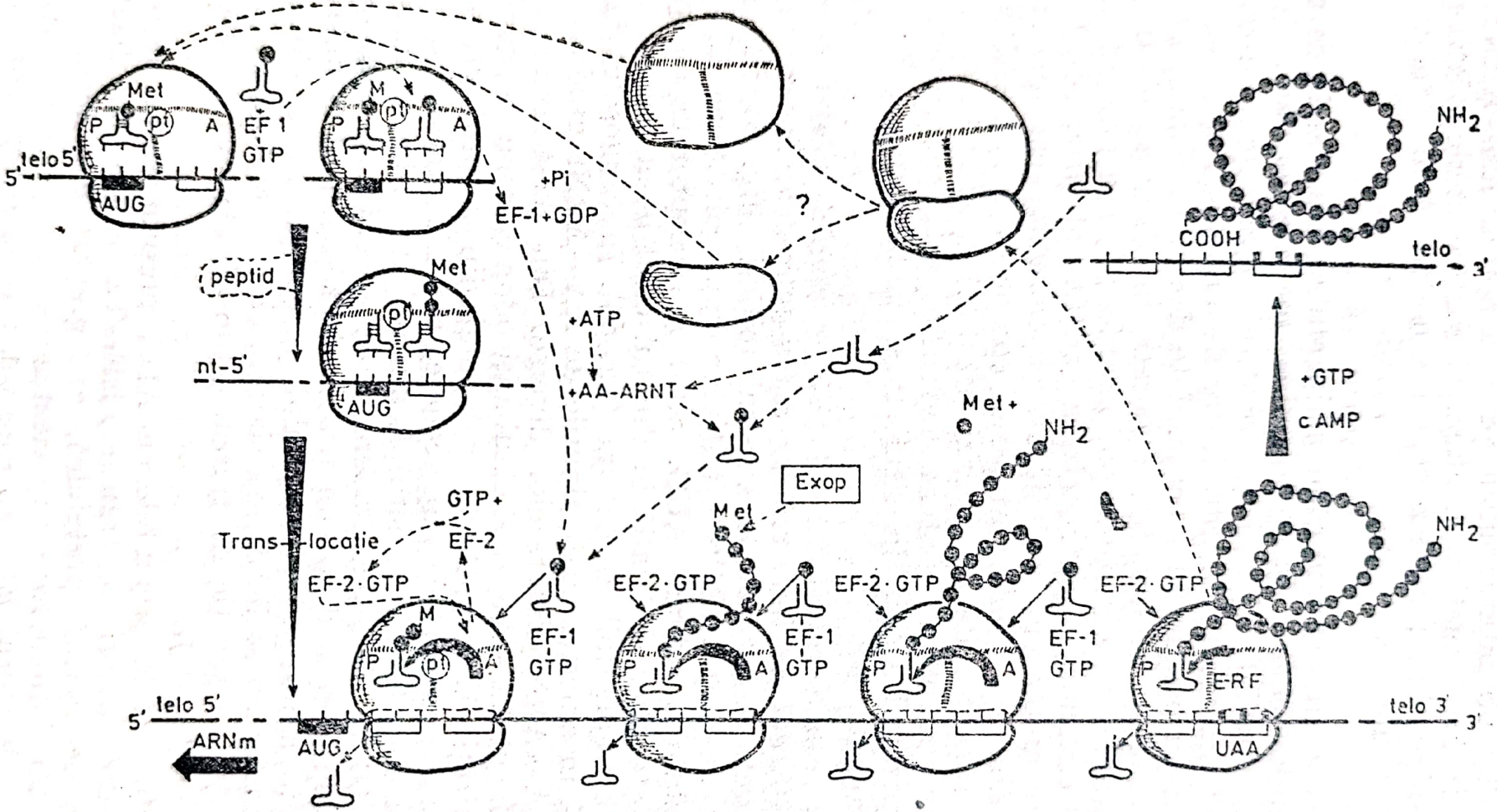


Fig. 54. **Elongația și terminalizarea în sinteza unui lanț polipeptidic.** Exop = metionil — exopeptidaza aminoterminală; pt = peptidil-transferaza. Săgeata orizontală inferioară indică direcția de migrare a ARNm pe polizomul format prin angajarea succesivă de ribozomi.

Scanned with OKEN Scanner

Afinitatea de agregare reciprocă este atît de mare, încît formează un complex EF—T care a fost purificat şi cristalizat ca o moleculă unitară. Dacă înainte de agregare EF—Tu are legată o moleculă de GDP, cea din urmă este dislocată din combinaţie, de EF—Ts. Conform datelor raportate de Lucas-Lenard şi Lipman (1966), participarea factorilor EF la transferul unui AA—ARNt din celulosol în situl A din complexul de elongaţie are loc în următoarea succesiune de reacţii:

1) formarea complexului activ:

$$EF—Tu \cdot GDP + EF—Ts \rightarrow EF—Tu \cdot EF—Ts + GDP;$$

2) formarea complexului GTP activat:

$$EF—Tu \cdot EF—Ts + GTP + AA—ARNt \rightarrow AA—ARNt \cdot EF—Tu \cdot GTP + EF—Ts;$$

3) legarea la complexul de elongaţie:

$$AA—ARNt \cdot EF—Tu \cdot GTP \xrightarrow[+\,ARNm]{+\,ribozom} (AA \cdot ARNt—ARNm—ribozom) + EF—Tu \cdot GDP + Pi.$$

Primele două reacţii se dezvoltă în celulosol, eliberează factorul EF—Ts care participă catalitic la formarea altor complexe active EF—Tu · EF—Ts, activează pentru transfer concomitent toate tipurile de AA—ARNt exceptînd pe cei iniţiatori şi prepară energetic, prin legarea GTP, reacţia finală de ataşare. Cea de-a treia reacţie are loc după ataşare la ribozom şi consumă energia eliberată de descompunerea GTP în GDP şi fosfor anorganic sub acţiunea EF—Tu. Activitatea guanozintrifosfatazică a EF—Tu este declanşată odată cu schimbările conformaţionale induse de ataşarea la complexul de elongaţie. Aceste schimbări provoacă şi desprinderea agregatului EF—Tu · GDP şi participarea lui catalitică la altă reacţie de transfer.

La eucariote, pentru sinteza de polipeptide care se desfăşoară fie în citoplasmă, fie în nucleu, s-a descris un singur factor de elongaţie cu funcţie de transfer, denumit EF—1 sau E—EF—1 *(eukariotic elongation factor)*. Pînă nu de mult era denumit factorul T—1. Factorul EF—1 este o proteină trimeră de 186 000 daltoni, are drept cofactor energetic GTP şi reacţionează cu toate tipurile de AA—ARNt, exceptînd Met-ARNt$_f$. Prima parte a reacţiei de transfer este independentă de complexul de elongaţie şi are loc în modul următor:

$$EF—1 + GTP + AA—ARNt \rightarrow AA—ARNt \cdot EF—1 \cdot GTP.$$

Scanned with OKEN Scanner

Acest agregat a fost pus în evidență în stare liberă pentru majoritatea tipurilor de AA—ARNt. Reacția de atașare la complexul de elongație se produce astfel:

$$AA—ARNt \cdot EF—1 \cdot GTP + \xrightarrow[ARNm]{ribozom} (AA—ARNt — ARNm — ribozom) + EF—1 + GDP + Pi.$$

Atașarea este consumatoare de energie, deoarece necesită descompunerea GTP sub acțiunea guanozintrifosfatazică a factorului EF—1 indusă în momentul asocierii cu complexul de elongație. Concomitent atașării, factorii EF—1 și GDP sînt eliberați în celulosol unde sînt din nou antrenați în alte transferuri de AA—ARNt. *In vitro* s-a constatat că factorul EF—1 poate fi înlocuit de complexul procariotic EF—Tu · EF—Ts care are capacitatea să medieze atașarea de AA—ARNt la complexul de elongație eucariotic. În schimb, factorul EF—1 nu este capabil să îndeplinească aceeași reacție cu complexul procariotic de elongație.

Referit la fluxul de informație genetică, procesul de atașare a AA—ARNt este cel mai important, deoarece desfășurarea lui este dominată de împerecherea specifică dintre codon și anticodon. Prin aceasta ARNm își îndeplinește funcția de matriță iar ARNt, funcția de adaptor specific. În atașarea fiecărui aminoacid participă aceiași factori, iar complexele activate se formează în celulosol independent de matrița informațională. Activitatea informațională apare numai în ultima parte cînd AA--ARNt cuprins în complexul activat imprimă specificitatea de adaptare a aminoacidului potrivit în poziția sa corespunzătoare, prin interacțiunea codon-anticodon. Referitor la situl A de pe subunitatea ribozomală mare, simbolizarea sa a fost sugerată de funcția de acceptare și legare a complexului AA—ARNt la fiecare reacție de atașare din elongație. De la această regulă face excepție legarea AA—ARNt inițiator care se atașează sitului P, dar nu în elongație, ci în inițiere, așa cum s-a mai descris.

2. *Sinteza legăturii peptidice.* Reacția de sinteză a legăturii peptidice considerată independent nu are specificitate informațională și este catalizată de o enzimă care face parte din structura subunității ribozomale mari (fie 50 S, fie 60 S). Datorită activității biochimice specifice, este denumită peptidil-sintetază sau peptidil-transferază. Activitatea catalitică a enzimei este condiționată de poziția spațială a aminoacililor activați aflați în complexele AA—ARNt legate în siturile P și respectiv A din constituția subunității ribozomale mari (fig. 54). Cele două situri P și A au raporturi spațiale care facilitează apropierea grupării amino a aminoacilului din complexul AA—ARNt legat în situl A, de gruparea carboxil activată a aminoacilului din complexul AA—ARNt atașat sitului P. Peptidil-transferaza cata-

Scanned with OKEN Scanner

lizează atacul nucleofilic exercitat de gruparea amino asupra funcției carbonil mai săracă în electroni și posesoare a unei legături macroergice formată din etapa activării aminoacizilor. Prin această interacțiune legătura macroergică se rupe, carboxilul activat al aminoacilului din situl P este legat covalent de gruparea aminată a aminoacilului din situl A, astfel sintetizîndu-se legătura peptidică. Sinteza legăturii peptidice are concomitent următoarele consecințe: 1) complexul AA—ARNt din situl A poartă acum încă un rest aminoacil; 2) complexul AA—ARNt din situl P donează restul aminoacil iar ARNt din acest sit rămîne fără aminoacid, de aceea situl P mai este numit și sit „donor"; 3) se produce un transfer de aminoacil sit P → sit A, motiv pentru care enzima este mai frecvent numită peptidil-transferază decît peptidil-sintetază (fig. 54). Peptidil-transferaza este tot un factor de elongație, dar neasemănător celorlalți EF, nu este eliberată în mediu și nu folosește drept cofactor energetic GTP, ci energia înmagazinată în legătură macroergică AA ~ ARNt. Uneori sinteza legăturii peptidice la nivelul complexului ribozomal este denumită cu termenul de transpeptidare (engl. *transpeptidation*).

3. *Translocațiile din procesul elongației.* Dacă termenul de „transfer" are o utilizare multivalentă (se referă la migrări de particule subatomice, grupări funcționale, molecule mici, macromolecule), termenul analog de translocație este utilizat în genetică pentru a descrie modificările reciproce de poziție ale unor agregate moleculare sau macromolecule, însoțite de schimbări ale raporturilor de interconectare (raporturilor topologice). Uneori translocația este dependentă specific de enzime denumite translocaze care au drept cofactori energetici fie GTP, fie ATP. Acesta este cazul celei de-a treia reacții complexe din încorporarea unui aminoacid în procesul de elongație. Imediat după sinteza legăturii peptidice au loc modificări de translocație. Evenimentele de translocație sînt consecința activității unui factor de elongație cu funcția de translocază.

La procariote și la organitele cu ADN extranuclear de la eucariote (mitocondrii, cloroplaste) activitatea translocazică este îndeplinită de factorul EF—G, denumit astfel datorită efectului său guanozintrifosfatazic ribozom-dependent. EF—G este o proteină cu greutatea moleculară de 72 000 — 84 000 daltoni, la bacteriile în creștere reprezintă aproximativ 6% din totalul proteinelor celulare, activitatea sa este inhibată de cloramfenicol; nu este inhibat de cicloheximidă și de toxina difterică. Are drept cofactor energetic obligatoriu, GTP.

La eucariote, în sinteza citoplasmatică a lanțurilor polipeptidice, translocația din procesul elongației este asigurată de factorul EF—2. Acesta este de natură proteinică, are greutatea moleculară de 60 000—65 000 daltoni, se află liber în celulosol și este atașat complexului de elongație după fiecare sinteză de legătură peptidică. Se leagă

Scanned with OKEN Scanner

numai de ribozomii 80 S și nu are afinitate pentru subunitățile 40 S sau 60 S libere. Înainte de atașarea la complexul de elongație leagă și GTP și dobîndește activitate guanozin-trifosfatazică numai după legarea de ribozom. Factorul EF—2 este inhibat puternic de toxina difterică în prezența NAD. Inhibiția este reversibilă, deoarece adăugarea de nicotinamidă în exces reactivează factorul EF—2. Mecanismul de acțiune al toxinei este parțial enzimatic. În prezența EF—2, toxina descompune NAD iar restul riboadenilic al acestuia constituie o punte covalentă între cele două macromolecule. Ca urmare se stabilește un complex EF—2 • riboadenil • toxină. Complexul ternar respectiv sedimentează ca o unitate moleculară la ultracentrifugare. Adăugarea de nicotinamidă în exces rupe legătura EF—2 • • riboadenil din complex și reconstituie o structură inițială NAD-toxină. EF — 2 blocat în complex este incapabil să mai participe la sinteza proteinelor, ceea ce explică molecular efectul toxic al infecției difterice. Efectul primar al toxinei constă în împiedicarea interacțiunii EF—2 cu GTP printr-o afinitate competitivă dintre riboadenil-toxină și GTP față de situl de legare specific. Această aserțiune se sprijină pe faptul că excesul de GTP împiedică formarea complexului EF—2 • riboadenil • toxină. Deoarece toxina difterică nu pătrunde intracelular, activitatea toxică s-ar exercita prin adsorbția toxinei la suprafața celulei, intercalarea în structura semifluidă a membranei citoplasmatice și captarea progresivă a EF—2 în complexul NAD dependent. Blocarea periferică a lui EF—2 se produce pe măsură ce acest factor este eliberat de elongație. Sinteza polipeptidelor scade progresiv pînă la oprirea completă. Factorul EF—2 este inhibat de cicloheximidă, în schimb nu este inhibat de cloramfenicol.

Reacțiile de translocație catalizate fie de EF—G, fie de EF—2 sînt analoage și se desfășoară în modul următor. EF—2 (sau EF—G) enzimatic inactiv are mare afinitate pentru GTP pe care îl leagă. Imediat interacționează cu ribozomul angajat în complexul de elongație și se asociază acestuia. În momentul atașării proprietatea guanozin-trifosfatazică a factorului este declanșată, GTP este descompus în GDP și un rest fosforic, iar energia eliberată induce o schimbare conformațională a întregului ribozom și a factorului legat. Schimbarea conformațională pe întregul ansamblu are ca rezultat următoarele translocații: situl P desprinde ARNt fără aminoacil, îl eliberează în celulosol și rămîne gol; complexul peptidil-ARNt din situl A migrează în situl P datorită acțiunii directe a factorului EF—2 (sau EF—G) a cărei proprietate translocazică este activată; ARNm este mobilizat cu trei nucleotide înspre direcția 5′, în așa fel că în dreptul sitului A rămas liber se găsește un nou codon din segmentul traductibil; translocaza este eliberată în mediu ca formă inactivă independentă de GDP. De fapt, factorii de translocație

Scanned with OKEN Scanner

(fie EF—G, fie EF—2) nu au afinitate pentru GDP, ci pentru GTP. Translocația încheie ciclul de încorporare a unui aminoacid în poziția sa specifică dintr-un polipeptid pe cale de sinteză.

4. *Sinteza lanțului polipeptidic prin elongație este o succesiune a ciclurilor de încorporare aminoacidică.* Reacția de translocație efectuează prepararea complexului de elongație pentru încorporarea unui nou aminoacid printr-o repetare a ciclului de trei reacții descrise mai sus. Acest ciclu de încorporare, atașarea AA—ARNt-sinteza legăturii peptidice-complex de translocații, se repetă succesiv pentru fiecare rest aminoacil. După fiecare ciclu lanțul polipeptidic născînd crește cu încă un aminoacil (fig. 54) pînă cînd întregul lanț polipeptidic este sintetizat. Exceptînd peptidil-transferaza, ceilalți factori de elongație — fie de atașare, fie de translocație — sînt îndepărtați obligatoriu din complexul de elongație imediat ce și-au îndeplinit funcția și participă repetat, catalitic în alt ciclu de elongație, fie în sinteza altor lanțuri polipeptidice desfășurată concomitent pe alți ribozomi, fie în sinteza aceluiași lanț. Pe un ribozom 80 S (sau 70 S la procariote) se sintetizează un singur lanț polipeptidic. Introducerea unui aminoacid într-o structură polipeptidică prin ciclul de trei reacții durează 0,3—0,5 s, astfel că un polipeptid de mărimea lanțului β al hemoglobinei A umane este sintetizat în decurs de un minut. În procesul elongației, ribozomul filează pas cu pas (codon cu codon) segmentul traductibil de ARNm corepunzător lanțului polipeptidic, mobilizîndu-l prin schimbările conformaționale ritmice impuse de efectul translocator al factorului EF—2 (EF—G la procariote). Sursa energetică a schimbărilor conformaționale de translocație este constituită de GTP. Pînă nu demult a existat dilema: ribozomul migrează pe matrița ARNm, sau ARNm este mobilizat pe ribozom? Cel puțin două observații pledează pentru migrarea ARNm: 1) la celulele eucariote (mai ales cele producătoare de proteine de export) ribozomii sînt atașați de membranele reticulului endoplasmatic, sînt fixați așa cum i-a descris Palade (1955, 1956) sub denumirea de granule și „tracționează" ARNm sintetizînd totodată și proteine; 2) în infecția celulei de *E. coli* cu bacteriofag ARN molecula de ARN fagic pătrunde cu telosegmentul 5′ și apoi este tracționată în celula gazdă prin complexarea cu ribozomii în procesul de sinteză a proteinelor timpurii din ciclul vegetativ; inhibiția sintezei de proteine blochează intrarea ARN-fagic.

5. *Polizomii (poliribozomii), structuri ale elongației.* Migrarea ARNm, codon cu codon, datorită schimbărilor conformaționale pulsatorii ale ribozomului, conduce la situația ca telosegmentul netraductibil 5′, codonul inițiator și ceilalți codoni ai segmentului traductibil care urmează să fie proiectați în afara complexului de elongație ca segment catenar liber. Regiunea codonului inițiator devine steric aptă să interacționeze într-un nou proces de inițiere. Acesta

Scanned with OKEN Scanner

se produce, formează un alt ribozom care alcătuiește un nou complex de elongație, tracționează matrița ARNm și sintetizează un alt lanț polipeptidic. Cel de-al doilea ribozom eliberează, la rîndul lui, progresiv situl de inițiere al matriței ARNm, fapt care permite inițierea și formarea celui de-al treilea ribozom. Ca urmare se stabilește o unitate structurală care conține mai mulți ribozomi solidarizați între ei prin filamentul de ARNm matriță, denumită sugestiv polizom (poliribozom). Pe fiecare ribozom din unitatea polizomală se sintetizează cîte un lanț polipeptidic de același fel, iar polipeptidele născînde sînt cu atît mai lungi cu cît ribozomii purtători sînt mai îndepărtați de situl de inițiere (fig. 54). Tratarea polizomilor cu ribonucleză are ca rezultat dezintegrarea lor în ribozomi, ceea ce dovedește că matrița ARNm este puntea de solidarizare a structurii polizomice. Tratamentul cu ribonucleză nu dezintegrează fragmentele ARNm din dreptul ribozomilor, fapt care susține concepția că situl ribozomal pentru ARNm are structura fie a unei adîncituri în care ribonucleaza nu poate pătrunde, fie a unui tunel inaccesibil enzimei. Același tratament enzimatic a permis stabilirea distanțelor interribozomale apreciate la 60 — 80 de resturi nucleotidice. Mărimea polizomilor este variabilă în raport cu lungimea moleculei de ARNm și, bineînțeles, cu lungimea lanțului polipeptidic de sintetizat. Polizomii pentru proinsulină au numai 3 ribozomi, polizomii pentru lanțurile hemoglobinice au 4 — 6 ribozomi, polizomii pentru imunoglobuline au 10 — 20 de ribozomi. Studiile electronografice au demonstrat că polizomii pot lua configurații spațiale diferite. În general, cei scurți sînt liniari iar cei lungi pot dobîndi fie orientări elicoidale, fie în rozetă.

4. **Terminarea sintezei lanțului polipeptidic.** Lanțurile polipeptidice sintetizate *in vivo* își păstrează caracterele lor moleculare diverse printre care și lungimea, atît în succesiunea de generații, cît și în dezvoltarea ontogenică. Lungimea limitată a diferitelor lanțuri polipeptidice, cît și păstrarea ereditară a acestei trăsături au sugerat existența unui semnal care să codifice în transferul de informație genetică terminarea specifică a încorporării de aminoacizi în procesul de elongație a unui lanț polipeptidic. Prin terminarea sintezei polipeptidice se înțelege oprirea ciclurilor de încorporare aminoacidică într-un lanț polipeptidic născînd, desprinderea acestuia de ultimul ARNt și desfacerea complexului de elongație cu eliberarea ribozonului și a ARNm. Încă din etapa corifeică a geneticii moleculare nu s-a admis ipoteza că extremitatea 3′ a ARNm ar determina terminarea prin epuizarea codonilor traduși în procesul de elongație. Lucrările clasice ale lui Brenner și colab. (1964, 1965, 1966) au indicat că semnalele de terminare sînt codonii nonsens UAA, UAG și UGA, denumiți de atunci codoni terminatori. Ganoza în 1966 descope-

Scanned with OKEN Scanner

ră existența de factori terminatori pe care i-a denumit RF (engl. *release factors* = factori de eliberare) capabili să interacționeze specific la nivelul codonilor terminatori.

1. *Codonii terminatori și situl de terminare din ARNm.* Identificarea codonilor terminatori a fost efectuată prin metode moleculare. Au fost folosite următoarele metode: 1) Mutațiile care produc terminarea timpurie și sinteza incompletă a unui lanț polipeptidic. De exemplu, dacă un polipeptid normal are 100 de aminoacili, organismul mutant produce numai segmente aminoterminale mai mici (5, 10, 60 de aminoacili), dar totdeauna aceleași pentru un mutant dat. Acești mutanți au fost descoperiți în categoria mutațiilor amber la bacteriofagi (cap. XII).

2) Mutațiile supresoare în genele ARNt. Acestea au produs categorii de ARNt capabile să recunoască și să se lege la nivelul codonilor terminatori.

3) Folosirea de oligo- sau poliribonucleotide sintetice pentru sinteza *in vitro* de oligopeptide sau polipeptide. S-a observat, de exemplu, că oligonucleotidul AUGUUUUAA cu trei codoni specifică sinteza dipeptidului fMet—Phe, codonul UAA provocînd eliberarea dipeptidului din complexul de elongație. S-a utilizat și un poliribonucleotid care avea repetată secvența GUAA : GUAAGUAAGUAAGUAA etc. Acest polinucleotid, în sistemele acelulare de sinteză, nu specifica decît tripeptidul Val—Ser—Lys, deoarece al patrulea codon era terminator :

5′ · GUA · AGU · AAG · UAA . . . . . 3′
Val—Ser—Lys—(terminator).

Cu toate că poli(GUAA) avea zeci de codoni, sinteza unui polipeptid nu era posibilă, deoarece prin succesiunea nucleotidică tot a patra tripletă era codon UAA. Rezultatul a demonstrat neechivoc funcția de terminator a codonului UAA;

4) Efectul de eliberare a f—Met—ARNt^{Met} inițiator cînd există succesiunea codon inițiator – codon terminator. Metoda a folosit în sinteza peptidică oligonucleotide în care primul codon era cel inițiator (AUG) iar al doilea variabil. Codonul al doilea trebuia să încorporeze aminoacili corespunzători, cu excepția situațiilor cînd codonul inițiator era urmat de un codon terminator. În acest caz f—Met-ARNt^{Met} era eliberat din complexul de inițiere neproducîndu-se nici un oligopeptid (Caskey și colab., 1968). Cercetîndu-se 42 de variante s-a constatat că numai trei codoni adiacenți inițiatorului AUG provocau desfacerea f—Met—ARNt^{Met} fără continuarea încorporării, aceștia fiind codonii UAA, UAG și UGA.

5) Determinarea secvenței nucleotidice prin tehnica Sanger (1965) a pus în evidență codonii terminatori pentru diferite proteine. Metodele de mai sus, pe lîngă faptul că au stabilit neechivoc natura

Scanned with OKEN Scanner

codonilor terminatori, au demonstrat că în 10 — 13% din cazuri codonii terminatori se găsesc în tandemul UAA · UAG, au stabilit universalitatea celor trei codoni UAA, UAG, UGA ca fiind terminatori la toate organismele și au precizat situația interiorizată a codonilor terminatori. Ultima observație este rodul metodelor de secvențiere a diferitelor molecule de ARNm (Proudfoot și Brownlee, 1976) și demonstrează că totdeauna cînd s-a cercetat, codonul terminator nu a constituit trinucleotidul 3′ terminal al unui ARNm. După codonul terminator există un telosegment netradus din care o parte este formată dintr-un acid poliadenilic variabil ca lungime. Segmentul poliadenilic 3′ terminal lipsește de la ARNm pentru histone. Deși funcția telosegmentului 3′ nu este precizată s-a constatat că secvențele nucleotidice care-l alcătuiesc sînt analoage la diverse tipuri de ARNm de la diferite grupări taxonomice, ceea ce sugerează posibilitatea ca telosegmentul 3′ să aibă un rol în terminare. Astfel, terminarea are ca element structural în ARNm un sit de terminare format dintr-un codon terminator, mai rar din doi codoni terminatori în tandem și posibil telosegmentul 3′.

2. *Factorii terminatori.* Sînt simbolizați cu literele RF (engl. *release factors* = factori de eliberare), sînt de natură proteinică, solubili în apă, se găsesc peste tot în celula vie, liberi în celulosol și interacționează cu complexul de elongație numai în momentul cînd codonul terminator ajunge în dreptul sitului A.

La procariote și la organitele cu ADN propriu de la eucariote s-au descris trei factori. Factorul RF—1 are greutatea moleculară de 44 000 daltoni, este monomer și interacționează cu codonii UAA și/sau UAG. Factorul R—2 are masa de 47 000 daltoni, interacționează fie cu UAA, fie cu UGA și nu interacționează cu UAG. Factorul RF—3, denumit și S(engl. *stimulating*), are capacitatea să stimuleze (să grăbească și să potențeze) acțiunea factorilor RF—1 și RF—2, dar nu este capabil singur să promoveze terminarea. RF—3 interacționează fie cu GDP, fie cu GTP și în această condiție induce disocierea de ribozom a factorilor RF—1 sau RF—2. Ultimii doi factori interacționează cu ribozomii 50 S la nivelul unui sit la care participă structural proteinele ribozomale L7 și L12. La eucariote s-a izolat și studiat un singur factor terminator denumit E—RF (engl. *eukariotic release factor*). Acesta este de natură proteinică, are o structură multimerică, are greutatea moleculară de 255 000 daltoni, are drept cofactor energetic GTP și cofactor stimulator de legare cAMP (adenozinmonofosfat 5′, 3′-ciclic). S-au descris forme moleculare multiple pentru E—RF, cu proprietăți fizico-chimice diferite. Fiecare formă moleculară are însă proprietăți funcționale asemănătoare.

3. *Mecanismul de terminare a sintezei unui lanț polipeptidic.* Deși diferențele dintre factorii terminatori sînt semnificative, mecanis-

Scanned with OKEN Scanner

mele terminării sînt asemănătoare la procariote și la eucariote. Cînd translocația ARNm aduce în dreptul sitului A codonul terminator, repetarea ciclică a încorporării organizate de aminoacizi se oprește, deoarece pentru codonul terminator nu există un complex AA—ARNt specific. Configurația codonilor terminatori împreună cu aceea a ribozomului eliberat de factorul translocator constituie o conformație specifică legării unui factor terminator (fie RF—1, fie RF—2 la procariote, fie E—RF la eucariote). Legarea acestuia are următoarele efecte dezvoltate aproape instantaneu (fig. 54): 1) Activarea peptidil-transferazei care desface hidrolitic legătura dintre extremitatea carboxil a lanțului polipeptidic și ultimul ARNt aflați în situl P. Factorul RF legat ar schimba sensul de acțiune al enzimei dinspre sinteză spre hidroliză. Oricum, enzima are și în elongație o dublă acțiune, de rupere a legăturii AA—ARNt concomitentă cu sinteza legăturii peptidice. În terminare factorul RF ar activa enzima care produce primul efect, iar al doilea nu-l mai poate avea întrucît nu are substrat. Codonul terminator nu a mai fixat un aminoacil activat—ARNt. Prin această acțiune, polipeptidul sintetizat este eliberat în celulosolul înconjurător. 2) Schimbări conformaționale ale ribozomului și factorului RF legat. Schimbările respective au ca efect eliberarea ARNt din situl P, desprinderea ribozomului de pe matrice și detașarea factorului terminator angajat.

La procariote, activitatea de terminare fie a RF—1, fie a RF—2 este potențată și accelerată de factorul RF—3 care — interacționînd apoi fie cu GDP, fie cu GTP — contribuie la desprinderea factorului terminator propriu-zis de pe suprafața ribozomului. La eucariote, E—RF are efect guanozintrifosfatazic asupra cofactorului energetic GTP, iar energia eliberată prin desprinderea restului γ fosforic este necesară interacțiunii cu ribozomul. Factorul terminator eucariotic mai este dependent în potențarea și accelerarea activității sale de cAMP care acționează drept cofactor stimulator.

5. **Caracterele ansamblului de reacții din traducerea mesajului genetic, raporturile numerice dintre ARNm și lanțurile polipeptidice; erorile inerente traducerii.** Multitudinea de factori și interacțiuni complexe participante în sinteza unui lanț polipeptidic diluează într-o așa măsură caracterele de ansamblu ale acestei etape de transfer al informației genetice, încît se ajunge la situația descrisă de proverbul „a nu vedea pădurea din cauza copacilor". De aceea, cu tot riscul unei repetări redundante, se impune o descriere a caracterelor de ansamblu ale reacției de traducere.

1. *Caracterele generale ale sintezei lanțurilor polipeptidice precursoare proteinelor funcționale.* Sinteza lanțurilor polipeptidice începe de la extremitatea aminoterminală, este progresiv crescătoare prin extremitatea carboxil a polipeptidului născînd și se termină la extre-

Scanned with OKEN Scanner

mitatea carboxiterminală. ARNm participă ca matriță de specificare a aminoacizilor cu un segment traductibil interiorizat de telosegmente netraductibile. Segmentul traductibil este cuprins între un codon inițiator AUG, universal același, și un codon terminator, mai rar doi codoni terminatori. Codonii terminatori sînt UAA, UAG și UGA ubicvitar aceiași. Segmentul traductibil din ARNm specifică aminoacizii prin codonii săi în direcția 5′ → 3′ și migrează în complexul polizomal în sens invers cu extremitatea 5′ înainte. Analiza secvențelor de aminoacizi din polipeptidul sintetizat și a secvenței nucleotidice din segmentul traductibil al matriței ARNm a dovedit că succesiunea de codoni corespunde succesiunii de aminoacizi încorporați, motiv pentru care această relație de cod a fost numită coliniaritate între ARNm și lanțul polipeptidic corespunzător. Atît pentru inițiere, cît și pentru terminare s-au diversificat în evoluție factori specializați ad hoc și complexe de interacțiuni care sînt asemănătoare, dar neidentice. La eucariote s-a produs o complexare mai accentuată a inițierii. Pentru inițiere, pe lîngă situl inițiator există și un ARNt specializat, participant obligatoriu în formarea complexului inițiator și apoi a complexului de elongație. Acest ARNt inițiator introduce metionina la extremitatea aminoterminală (la procariote N-formil-metionina). În evoluția ARNt inițiator a existat un moment crucial cînd s-a dedublat în ARNt inițiator pentru procariote și ARNt inițiator pentru eucariote. Creșterea lanțului polipeptidic în elongație are loc aminoacil cu aminoacil. Încorporarea organizată și specifică a fiecărui aminoacid este un eveniment separat format din trei reacții: transfer și atașare specifică, sinteza legăturii peptidice și translocația. Referind sinteza polipeptidelor la sistemul informațional genetic descris în capitolul I, această sinteză de macromolecule reprezintă convertirea secvenței nucleotidice din ARNm în secvența de aminoacizi din polipeptid. În termeni informaționali, sinteza lanțului polipeptidic cu specificitățile ei de cod genetic reprezintă *traducerea* mesajului genetic. Angrenajul de factori și reacții biochimice decodifică mesajul genetic, îl traduce din „limbajul" codonilor în „limbajul" aminoacizilor. Din aceste motive, sinteza polipeptidelor se mai numește *traducere* sau *citire* a mesajului genetic. Cei din urmă termeni sînt frecvent folosiți ca atare în contextul geneticii moleculare. Traducerea genetică (engl. *genetic translation*) are două momente de mare specificitate: primul constă în reacția de activare a aminoacizilor în care prin specificitatea enzimelor sintetizatoare de complexe AA-ARNt, fiecare aminoacid este legat de molecula de ARNt corespunzătoare, iar al doilea este situat în reacția tripartită a citirii codonilor din elongație. În ambele momente se consumă energia eliberată de ruperea a cîte două legături macroergice de la ATP și respectiv GTP. Ca urmare, pentru încorporarea fiecărui aminoacid se consumă aproximativ 28,4 Kcal · mol^{-1} (7,1 × 4). Conform raționamentului lui Lehninger, energia de hidro-

Scanned with OKEN Scanner

liză a unei legături peptidice este de 5 Kcal mol^{-1} iar valoarea de 23,4 Kcal cheltuită în plus pentru sinteza acestei legături reprezintă excedentul energetic considerat ca factor esențial „care face posibilă fidelitatea mare a traducerii mesajului genetic din ARNm în secvența de aminoacizi din proteină" (Lehninger, 1974).

Structura extremităților unui lanț polipeptidic, cît și lungimea sînt caractere esențiale pentru alcătuirea unei proteine funcționale (vezi capitolul următor). Ca urmare, pentru fidelitatea traducerii codonilor inițiatori și codonilor terminatori, sînt prezente angrenaje particulare de factori, se investește separat energie, iar matrița ARNm este dotată cu telosegmente cantitativ importante al căror rol în inițiere și terminare este neîndoielnic. Segmentul traductibil din ARNm funcționează ca o unitate în etapa de traducere a transferului de informație genetică, iar constituirea lui are loc printr-o reacție de transcriere a unui segment de ADN din genom. Cele două reacții, de transcriere și de traducere, constituie la un loc procesul de codificare. Această relație informațională se află la baza definiției moderne a genei : prin genă se înțelege segmentul de ADN care codifică un lanț polipeptidic.

2. *Raporturile numerice dintre ARNm și lanțurile polipeptidice sintetizate, relațiile temporale dintre transcriere și traducere.* Procesul de codificare cuprinde o serie de relații numerice și structurale între unitățile funcționale macromoleculare participante, relații stabilite prin rezultatele experimentale ale diferitelor studii genetice, biochimice și de ultrastructură.

a) *Raportul numeric, genă/moleculă de ARNm/lanț polipeptidic și diversitatea acestuia.* În conformitate cu definiția genei, acest raport trebuie să fie triunivoc ; o genă/un ARNm/un lanț polipeptidic. Numeroase observații experimentale — obținute din studiile asupra moleculelor ARNm corespunzătoare lanțurilor imunoglobulinice, lanțurilor hemoglobinice, lanțului polipeptidic proinsulinic, lanțurilor α-1 și α-2 din procolagen — atestă conceptul raportului triunivoc în care pentru un lanț polipeptidic există o moleculă de ARNm și o genă corespunzătoare. Cunoașterea mai timpurie a secvenței aminoacizilor din lanțurile polipeptidice ale proteinelor funcționale a determinat utilizarea acestei corespondențe triunivoce pentru deducerea mărimii moleculelor de ARNm și a genelor. Raționamentul a fost extins pînă la aprecierea numărului de gene ale genomului uman (Krone și Wolf, 1972), cît și la alte organisme. Progresele mari făcute în determinarea directă a secvențelor nucleotidice au demonstrat însă că ARNm are numai o parte cu semnificație de codificare. În molecula ARNm sînt cuprinse telosegmente semnificativ de mari care nu sînt traduse în secvență de aminoacizi iar procesele de prelucrare scurtează adesea lanțurile polipeptidice rezultate direct din sinteza primară (vezi capitolul următor). Aceste fapte relevă aspectul incongruent al datelor

Scanned with OKEN Scanner

referitoare la dimensiunile moleculelor de ARNm şi genelor corespunzătoare, deduse din secvenţa de aminoacizi. De la raportul de codificare triunivoc o genă/un ARNm/un polipeptid s-au descris excepţii numeroase, în particular la bacterii şi bacteriofagi. Încă din epoca de pionierat, Ames şi Hartman (1963) cît şi Martin (1963) au demonstrat că genele codificatoare pentru o parte din enzimele participante în calea de sinteză a histidinei sînt transcrise într-un singur ARNm. Acesta este mai lung de cel puţin 10 ori decît o moleculă de ARNm care ar fi coliniar unui lanţ polipeptidic mediu. Ulterior s-a observat că grupările de gene cu organizare funcţională de reglaj coordonat sînt transcrise în ARN macromesageri plurigenici. Aceste observaţii au condus chiar şi la o reconsiderare oarecum izolată a înţelegerii termenului de genă. De exemplu, gena era definită ca segmentul de ADN care se transcrie într-o moleculă de ARNm. Această definiţie a rămas însă limitată datorită incongruenţei sale. Existenţa de ARNm plurigenic a solicitat explicaţii în plus asupra iniţierii şi terminării în traducerea diferitelor segmente. Trebuiau precizate raporturile de adiacenţă dintre codonii terminatori şi codonii iniţiatori ai segmentelor traductibile, era necesară precizarea asupra comportării ribozomilor în iniţiere şi terminare, dacă ribozomii sînt menţinuţi pe matriţa ARNm de-a lungul tuturor segmentelor traductibile şi dacă traducerea implică în aceste cazuri mecanisme particulare de iniţiere şi terminare. Determinarea secvenţelor ribonucleotidice ale moleculelor multigenice de ARNm natural aparţinînd fagilor ARN, cît şi ale ARNm multigenici de la bacterii a demonstrat inexistenţa de tandemuri naturale codon terminator — codon iniţiator, adică *UAA—AUG*, *UAG—AUG*, *UGA—AUG*. Aceleaşi determinări de secvenţe nucleotidice au indicat existenţa de segmente netraductibile de lungime remarcabilă, intercalate între segmentele traductibile corespunzătoare genelor. Prezenţa segmentelor netraductibile a condus la conceptul că fiecare segment care începe printr-un codon iniţiator este tradus printr-un ciclu propriu de iniţiere-elongaţie-terminare. Mecanismele de iniţiere şi terminare sînt aceleaşi ca şi la un ARNm monogenic (fig. 55). La fiecare

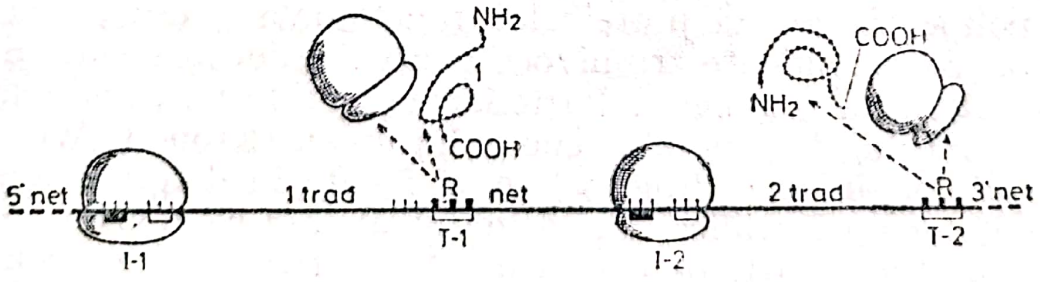


Fig. 55. Traducerea unui ARNm plurigenic. Între segmentele traductibile — 1-trad şi 2-trad-se află segmentul netraductibil -net. Segmentele traductibile încep cu un codon iniţiator şi sfîrşesc cu un codon terminator (T). R = complexul de factori de terminare care eliberează ribozomul şi polipeptidul la fiecare T.

Scanned with OKEN Scanner

codon terminator complexul de elongaţie se desface, ribozomii sînt eliberaţi în mediu iar segmentele intergenice sînt echivalente funcţional telosegmentelor 5′ şi 3′ de la moleculele ARNm cu un singur segment traductibil (fig. 54). În plus, segmentele intergenice au roluri variate în organizarea cantitativă a traducerii.

b) *Timpul de existenţă al moleculelor ARNm şi sinteza lanţurilor polipeptidice de acelaşi fel. Amplificarea expresiei genice prin traducere.* Structura polizomilor şi mecanismul lor de formare indică participarea unei molecule de ARNm la sinteza mai multor lanţuri polipeptidice. Un polizom este format din segmentul traductibil de ARNm pe care s-au angajat rînd pe rînd ribozomii în complexe de elongaţie separate iar pe fiecare ribozom se sintetizează cîte un lanţ polipeptidic. Odată cu terminarea sintezei unui lanţ polipeptidic ribozomul se desprinde, disociază spontan în subunităţile ribozomale care sînt reluate în primire de factorii de iniţiere pentru a fi reangajaţi la nivelul codonului iniţiator pe matriţa ARNm. Ca şi ceilalţi factori de traducere, ARNm are un circuit de participare şi un ciclu propriu de viaţă. Ciclul său de existenţă începe odată cu transcrierea, are o etapă de prelucrare structurală, urmează apoi stadiul funcţional şi sfîrşeşte prin dezintegrare în nucleotide libere. În raport cu durata ciclului de existenţă se descriu două categorii de ARNm: ARNm instabil găsit cu precădere la bacterii şi ARNm stabil demonstrat la eucariotele multicelulare mai ales la celulele specializate să producă mari cantităţi de proteină fie păstrate intracelular, fie secretate.

La procariote, unde genele sînt în raport direct cu citoplasma, etapele ciclului de existenţă a ARNm se suprapun. Imediat după începerea transcrierii, cînd extremitatea 5′ liberă este fizic suficient de mare, ARNm născînd se angajează direct în complexe de elongaţie cu ribozomii şi traducerea în lanţuri polipeptidice începe înainte ca transcrierea să se fi terminat. În consecinţă, există o suprapunere temporală a transcrierii cu traducerea. Ca urmare, desprinderea ARNm de pe ADN-matriţă are loc sub formă de agregat polizomal (cap. IV). ARNm procariotic participă apoi la sinteza a 10-20 de lanţuri polipeptidice şi se dezintegrează începînd cu extremitatea 5′.

La eucariote, suprapunerea etapelor din ciclul de existenţă a ARNm manifestă diversitate. Angajarea imediată în traducere concomitent cu transcrierea nu este posibilă nici pentru tipurile de ARNm care codifică proteinele specifice nucleului (histonele, proteinele cromozomale nehistonice), deoarece şi acestea sînt sintetizate în citoplasmă. ARNm histonic nu are acid poliadenilic la extremitatea 3′ şi în general are o viaţă scurtă (este de tip instabil), ceea ce se potriveşte cu durata scurtă de sinteză a histonelor (aproximativ 3-4 ore din prima parte a fazei S). Ca urmare este necesară o etapă de transport nucleo-citoplasmatic. Mecanismul migrării extranucleare nu este precizat, deşi domeniul nu este sărac în ipoteze. Spirin şi colab. (1964) şi Samarina

Scanned with OKEN Scanner

și colab. (1967) emit ipoteza unor complexări ale moleculelor premesagere cu proteine ale membranei nucleare, respectiv cu proteine specializate numite informative și formează fie informozomi, fie informoferi. Proudfoot și Brownlee (1976) presupun că telosegmentele netraductibile ar avea un rol particular în migrarea activă, prin interacțiunea cu proteine specializate pentru acest transport nucleo-citoplasmatic al ARNm. ARNm stabil durează mai multe ore și apoi este dezintegrat. Nu este încă precizat grupul de nucleaze care produc dezintegrarea. Cel mai discutat candidat rămîne polinucleotidfosforilaza propusă ca efector al acestui proces cu cel puțin 20 de ani în urmă.

În ambele ipostaze fie de ARNm stabil, fie de ARNm instabil, participarea ca matriță asigură sinteza mai multor lanțuri polipeptidice de același fel. Astfel, mecanismul traducerii asigură o amplificare a expresiei genice. Cu cît stabilitatea ARNm este mai mare, cu atît participarea ca matriță este multiplicată și cu atît amplificarea este mai semnificativă. Așa se explică stabilitatea apreciabilă a ARNm din celulele specializate în producerea de cantități mari ale unui singur tip de proteină (de exemplu, producerea de hemoglobină în reticulocite, sinteza de imunoglobuline în plasmocite).

c) *Erorile inerente traducerii.* Cu tot consumul impresionant de energie consacrat fidelității în traducere, factorii participanți cu specificitate pot comite erori ale căror cauze aparțin imperfecțiunilor de interacțiune spațială în momente variate ale sintezei polipeptidelor. Aceste erori mai pot fi numite intrinsece traducerii și se deosebesc de alte modificări a căror origine cauzală constă fie din intervenția de alterări mutaționale ale diferitelor categorii de factori (ARNm, ribozomi, ARNt, factorii de inițiere, de elongație, de terminare), fie din intervenția unor agenți alteranți ai traducerii ca analogi ai aminoacizilor, streptomicina, analogi ai AA-ARNt (puromicina) etc. Erorile intrinsece traducerii vizează cu preponderență activarea specifică a aminoacizilor, atașarea complexelor AA-ARNt în elongație și translocația. În activarea specifică a aminoacizilor, AA-ARNt-sintetazele s-au dovedit capabile *in vitro* să sintetizeze complexe eronate de AA-ARNt (de exemplu, Phe-ARNt^{Leu}). Deși cu probabilitate foarte mică, sinteza unor astfel de complexe eronate conduc și la încorporări eronate în procesul propriu-zis al traducerii; se formează lanțuri polipeptidice anormale.

În procesul de atașare care include interacțiunea cheie a traducerii, împerecherea anticodon-codon, unele specii de ARNt pot greși mai frecvent datorită literei a 3-a din anticodon. Conform ipotezei oscilatorii (*wobble*) a lui Crick (1966), o specie de ARNt poate recunoaște doi codoni sau chiar trei codoni în loc de unul singur, așa cum este obișnuit. Această proprietate este dată de a treia bază din anticodon care în împerechere manifestă un caracter oscilatoriu. De exemplu, U din anticodon în poziția a treia se poate împerechea cu A din poziția

Scanned with OKEN Scanner

a 3-a a unui codon, dar și cu un codon asemănător, diferit numai prin G în poziția a 3-a. De exemplu :

$$\text{anticodonul UAU.} \xrightarrow{\text{împerechere}} \begin{cases} \text{codon AUA (Ile)} \\ \text{codon AUG (Met)} \end{cases}$$

Astfel, $ARNt^{Ile}$ cu anticodonul UAU poate încorpora izoleucină în loc de metionină prin împerechere cu AUG. Erorile de translocație se produc prin căderea prematură din complexul de elongație a unui complex polipeptidil-ARNt datorită faptului că este „scăpat" de factorul translocator fie EF-G, fie E-EF 2. Polipeptidul „scăpat" conține la extremitatea carboxi ultimul ARNt (Chapeville și colab., 1969). Corectarea erorilor inerente traducerii este o funcție a proceselor degradative. Toate lanțurile polipeptidice anormale sînt rapid dezintegrate de proteaze degradative (vezi capitolul următor).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul IX

FORMAREA PROTEINELOR FUNCȚIONALE ȘI EXPRESIA GENICĂ. PRELUCRAREA POLIPEPTIDELOR PRECURSOARE

În conformitate cu principiul o genă — un lanț polipeptidic, polipeptidele, produse specifice ale codificării, sînt înșiruiri filiforme de resturi aminoacil de la extremitatea amino la extremitatea carboxi. Considerate în configurația liniară relativ bidimensională inspirată de coliniaritatea cu matrițele de codificare, lanțurile polipeptidice sînt nefuncționale și reprezintă precursori nefinisați ai proteinelor. În transferul de informație genetică, pînă la expresia genică finală, polipeptidele precursoare constituie substratul necesar al prelucrărilor prin care se formează proteinele „mature" funcționale. Procesele de prelucrare constau din totalitatea modificărilor survenite în configurația spațială, mărimea și structura lanțurilor polipeptidice, modificări care au drept rezultat producerea de proteine finisate, fiziologic active. Acestea sînt ultimele macromolecule care prin specificitatea lor funcțională asigură transferul de informație de la ansamblul genomic al genelor la ansamblul complex de caractere al viețuitoarelor.

1. Prelucrarea lanțurilor polipeptidice și constituirea proteinelor mature funcționale. Polipeptidele precursoare nu reprezintă o înșiruire rigidă de aminoacili. Unitățile peptidice în ansamblu permit inflexiuni, rotații periaxiale și torsionări de amploare considerabilă în toate direcțiile spațiale. Schimbărilor de configurație liniară, deși potențial sînt foarte diverse, li se imprimă direcții și conformații nealeatorii prin reactivitatea grupărilor funcționale ale radicalilor liberi ai aminoacililor care pot stabili spontan și specific majoritatea legăturilor nepeptidice stabilizatoare. Alături de acest potențial intrinsec de restructurare conformațională intervin prelucrări ale lanțurilor precursoare, exercitate de elemente extrinsece lanțului polipeptidic. Traducerea ca atare, descrisă în capitolul VIII, asigură structura primară a polipeptidelor care în starea precursoare prezintă, în toate cazurile studiate, plusuri de secvență aminoacidică. Aceste plusuri sînt eliminate din structură și nu mai sînt găsite în moleculele finisate funcționale. Prelucrările ulterioare traducerii pot fi împărțite în două categorii: a) prelucrări privind modificările sterice și secvențiale ale

Scanned with OKEN Scanner

lanţurilor polipeptidice, cît şi asamblarea acestora în structuri oligo- şi multimerice; b) agregări cu constituenţi neproteinici fie prin legare covalentă, fie necovalentă, fie mixtă.

1. *Prelucrări ale secvenţei polipeptidelor precursoare, modificările sterice şi formarea structurilor supraadăugate ale proteinelor.* În timpul sintezei de traducere, polipeptidul născînd proemineză din complexul polizomal în interacţiunile energiei libere şi în intersectările metabolismului intermediar din citosolul înconjurător. Acestea îi imprimă flexiuni şi torsiuni polipeptidului crescător cu extremitatea amino liberă, ceea ce asigură stabilirea de structuri secundare şi terţiare capabile să exercite funcţii străine de complexul polizomal, dar specifice proteinelor sintetizate.

Restructurările sterice şi secvenţiale pot fi clasificate astfel: stabilirea de legături nepeptidice intracatenare; formarea de aminoacili fără corespondenţă codonică; clivarea lanţului polipeptidic precursor cu sau fără excluderea fie de aminoacizi singulari, fie de segmente oligo- sau polipeptidice; stabilirea de structuri cuaternare.

a) *Stabilirea de legături nepeptidice intracatenare.* Începe din starea de polipeptid născînd şi constă din formarea de legături de hidrogen, eventual legături ionice şi legături apolare constituite din ansambluri de forţe Van der Waals. Apariţia lor este condiţionată pe de o parte de secvenţa de aminoacizi care le conferă specificitate regională raportată la întregul lanţ, iar pe de altă parte, de inflexiunile continue ale lanţului născînd induse de curenţii energetici ai energiei libere. Legăturile necovalente intracatenare stabilizează structurile secundară şi terţiară, orientează spaţial regiunile din lanţ posesoare de resturi cisteinil şi realizează configuraţiile potrivite formării legăturilor de disulfură, singurele legături covalente nepeptidice de largă răspîndire printre proteine. Legăturile de disulfură nu se formează aleatoriu, ci sînt condiţionate de secvenţa de aminoacizi şi de celelalte legături nepeptidice care orientează resturile cisteinil în poziţii învecinate care le conferă capacitatea să interacţioneze. Bazate pe experienţe *in vitro* de reconstituire a legăturilor —S — S —, există presupuneri că grupările sulfhidril ale resturilor cisteinil s-ar oxida şi spontan în condiţii de adiacenţă şi ar forma necatalitic puntea de disulfură. Numeroase opinii şi constatări experimentale susţin părerea că reacţia *in vivo* este enzimatică de tip transhidrogenazic. Se afirmă chiar că pentru punţile de disulfură ale fiecărei proteine cu astfel de punţi (insulina, imunoglubilinele, ribonucleaza) există cîte o enzimă specifică. De exemplu, cele trei punţi de disulfură ale insulinei se formează sub acţiunea catalitică a glutation-proinsulin-transhidrogenazei specifice.

Oricum, pentru legăturile nepeptidice transverse limitate la macromoleculele de colagen şi elastină nu există vreo presupunere că s-ar

Scanned with OKEN Scanner

forma spontan; acestea sînt consecința unei căi metabolice în care intervin cupluri diferite de enzime specifice.

b) *Formarea de aminoacili fără corespondență codonică.* Toți aminoacizii fără corespondență codonică găsiți în secvența aminoacidică a proteinelor sînt derivați ai resturilor aminoacil gata încorporate în structuri macromoleculare polipeptidice. Reacțiile de sinteză a acestor aminoacizi fac parte integrantă din procesul complex al prelucrării și ajustării polipeptidelor precursoare și de aceea sinteza lor *in vivo* nu produce aminoacizi liberi fără corespondență codonică, ci aminoacili care pot fi obținuți liberi numai prin hidroliza proteinelor purtătoare. O singură excepție de la această regulă ar putea f-o constitui fosfoserină căreia i s-a descris un ARNt specific izolat din ficatul de șobolan. Nu s-a demonstrat însă pînă în prezent că fosfoserina ar putea fi încorporată prin traducere într-un lanț polipeptidic. Formarea de aminoacili necodonici este legată și de finisarea glicoproteinelor, heteroproteine care prin răspîndirea lor constituie în totalitate cea mai mare parte a proteinelor întregului organism.

Aminoacilii necodonici rezultă din numeroase tipuri de reacții la care sînt expuse grupările funcționale ale radicalilor neangajați în legături peptidice. Aceste reacții sînt cel puțin următoarele: hidroxilare, dezaminare oxidativă, glicozilare, acetilare, fosforilare, ciclizare. Deși au trăsătura comună că fiecare generează un nou aminoacil prin formare catalitică de legături covalente, numai primele două produc aminoacili considerați în structura holoproteinelor, celelalte dau derivați implicați în legarea de grupe prostetice.

Hidroxilarea este întîlnită în formarea moleculelor de procolagen, de proelastină și interesează resturile lizil și prolil. Reacția de hidroxilare începe cînd lanțurile polipeptidice $\alpha 1$ și $\alpha 2$ din procolagen sînt încă născînde, este catalizată de peptidil-hidroxilaze specifice și nu interesează toate resturile lizil și prolil din polipeptidele precursoare. Lizil-hidroxilaza produce sinteza δ-hidroxi lizinei. Prolil-hidroxilaza este de două tipuri, prolil — 4-hidroxilaza și prolil — 3-hidroxilaza, dintre care prima este cea mai răspîndită.

Enzimele de hidroxilare sînt atașate sistemului cisternal al reticulului endoplasmic rugos, explicîndu-se astfel acțiunea lor specifică la nivelul polipeptidelor născînde.

Dezaminarea oxidativă este legată de formarea legăturilor transverse dintre moleculele mature de colagen în procesul de fibrogeneză. Interesează resturile lizil și hidroxilizil și este catalizată de o lizil-oxidază care utilizează tot O_2 molecular ca substrat oxidativ și produce derivații aldehidici, apă și amoniac (fig. 56). Din lizină se formează acid α aminoadipic-δ-semialdehida sau allizina iar din hidroxilizină se produce acid δ-hidroxi—α-amino adipic-δ-semialdehida sau hidroxiallizina. Resturile lizil, hidroxilizil, allizil și hidroxiallilizil

Scanned with OKEN Scanner

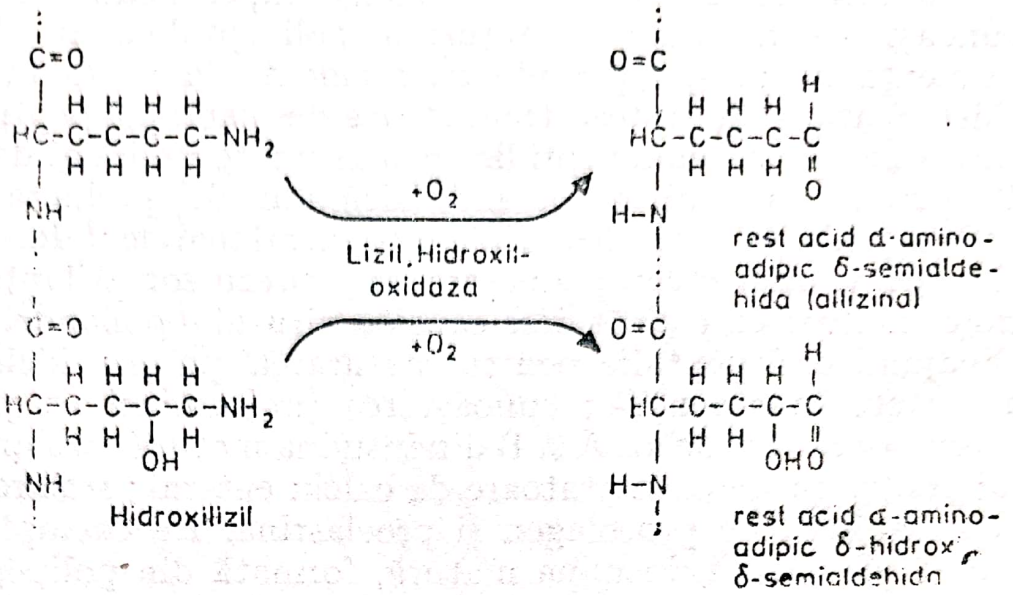


Fig. 56. **Dezaminarea oxidativă a resturilor lizil şi hidroxilizil** cu formarea allizinei şi respectiv hidroxiallizinei. Reacţiile au loc extracelular în cadrul fibrogenezei.

stabilesc legăturile transverse dintre moleculele de colagen în procesele de fibrogeneză.

c) *Clivarea lanţurilor precursoare cu sau fără excluderea de resturi aminoacil sau segmente polipeptidice întregi* constituie un mecanism general de prelucrare care începe tot timpuriu, din faza născîndă. Procesul este exercitat de peptidaze cu activitate la *p*H neutru, fiind deosebite atît de peptidazele şi proteazele acide din lizozomi, cît şi de proteazele degradative. Peptidazele neutre sînt de două tipuri: *expopeptidaze;* atacă hidrolitic lanţul polipeptidic numai la extremităţi şi desprind numai aminoacilul terminal; se divid la rîndul lor în aminopeptidaze şi carboxipeptidaze, datorită acţiunii selective pentru extremităţile amino şi respectiv carboxi ale lanţului polipeptidic; *endopeptidaze;* catalizează desfacerea hidrolitică a lanţului polipeptidic la mijlocul sau în interiorul secvenţei şi nu la extremităţi; endopeptidazele manifestă specificitate pentru lanţul polipeptidic pe care-l abordează.

O metionil-aminopeptidază fără specificitate de lanţ desprinde restul metionil codificat în iniţierea traducerii, de la majoritatea lanţurilor polipeptidice de la eucariote. Clivajul metioninic are loc în prima secundă a timpului de elongaţie, cînd polipeptidul născînd nu a atins încă lungimea de 20 de aminoacili. Acest fapt a determinat la eucariote (implicit la mamifere şi om) ca procesul de iniţiere a sintezei polipeptidelor să fie cunoscut mult mai tîrziu decît la bacterii. La acestea sînt două enzime cu acţiune timpurie în prelucrare: formilaza, care desprinde radicalul formil de la metionilul aminoterminal, şi aminopeptidaza, catalizatoare a clivajului metioninic aminoterminal la peste 60% din polipeptidele bacteriene.

Scanned with OKEN Scanner

Majoritatea sistemelor de model experimental care au căutat cunoaşterea timpurie a lanţurilor polipeptidice au demonstrat fie existenţa de pro-polipeptide cu segmente în exces faţă de polipeptidele mature, fie sinteza traductoare de macropolipeptide precursoare care sînt clivate endopeptidic în mai multe polipeptide mici mature. Răspîndirea ubicuitară a mecanismului de prelucrare prin clivaj endopeptidic a fost dovedită prin următoarele: descrierea sintezei timpurii a unui macropolipeptid unic precursor al lanţurilor polipeptidice mature care alcătuiesc capsida virusului poliomielitic; descrierea clivajului endopeptidic pentru maturarea polipeptidelor precursoare ale bacteriofagului T4; cunoaşterea proinsulinei ca polipeptid unic precursor al lanţurilor A şi B din insulina matură; izolarea precursorului pentru proteina captatoare de calciu enteral; izolarea de proglucagon; izolarea de procolagen şi proelastină. De exemplu, pentru ilustrarea prelucrării, insulina matură, formată din polipeptidele A şi B, este produsul de prelucrare al unui lanţ polipeptidic mai mare, preproinsulina, lung de 109 aminoacili cu încă două segmente: segmentul „director" (engl. *leader*) hidrofobic cuprinzînd primii 23 de aminoacili N-terminali; segmentul C (fig. 57) intermediar între segmentele A şi B. Preproinsulina devine proinsulină prin eliminarea segmentului director printr-o reacţie endopeptidazică timpurie. Lanţul proinsulinic se repliază şi în prezenţa cuplului transhidrogenază-glutation oxidat, replierile sînt consolidate catalitic prin trei legături disulfidice. Proinsulina rezultată este transferată la nivelul aparatului Golgi, unde are loc procesul de clivaj. O endopeptidază asemănătoare tripsinei desprinde lanţul C printr-o acţiune hidrolitică la nivelul celor două perechi de aminoacili bibazici şi rezultă molecula de insulină cu două lanţuri A şi B legate prin trei legături disulfidice (fig. 57). La extremitatea carboxilică a lanţului A persistă încă un rest arginil. Sub acţiunea unei carboxipeptidaze specifice restul arginil este îndepărtat şi procesul de maturare insulinică este terminat. Prelucrările de clivaj sînt specifice, deoarece cantităţile reziduale de proinsulină eliberate în torentul circulator nu pot fi convertite în insulină matură de alte sisteme de endopeptidaze extrainsulare, ci numai de cele din celulele β. Segmentul C rezultat din clivajul de prelucrare este degradat catabolic la nivelul pancreasului. În consecinţă, producerea de insulină, caracter genetic stabil şi vital, este rezultatul acţiunii genelor de proinsulină, de proinsulin-glutation transhidrogenază, de endopeptidază proinsulinică şi de exopeptidază insulinică A.

Fibrogeneza colagenului cuprinde numeroase etape posttraductoare în care intervin produsele de expresie genică a cel puţin 8 gene diferite. Corespunzător proceselor de prelucrare ale polipeptidelor procolagenice α_1 şi α_2, ilustrate în fig. 58, în fibrogeneza colagenică participă produşii următoarelor gene: gena pentru lanţul α_1, gena pentru lanţul α_2, gena pentru lizil-hidroxilază, gena pentru prolil-hi-

Scanned with OKEN Scanner

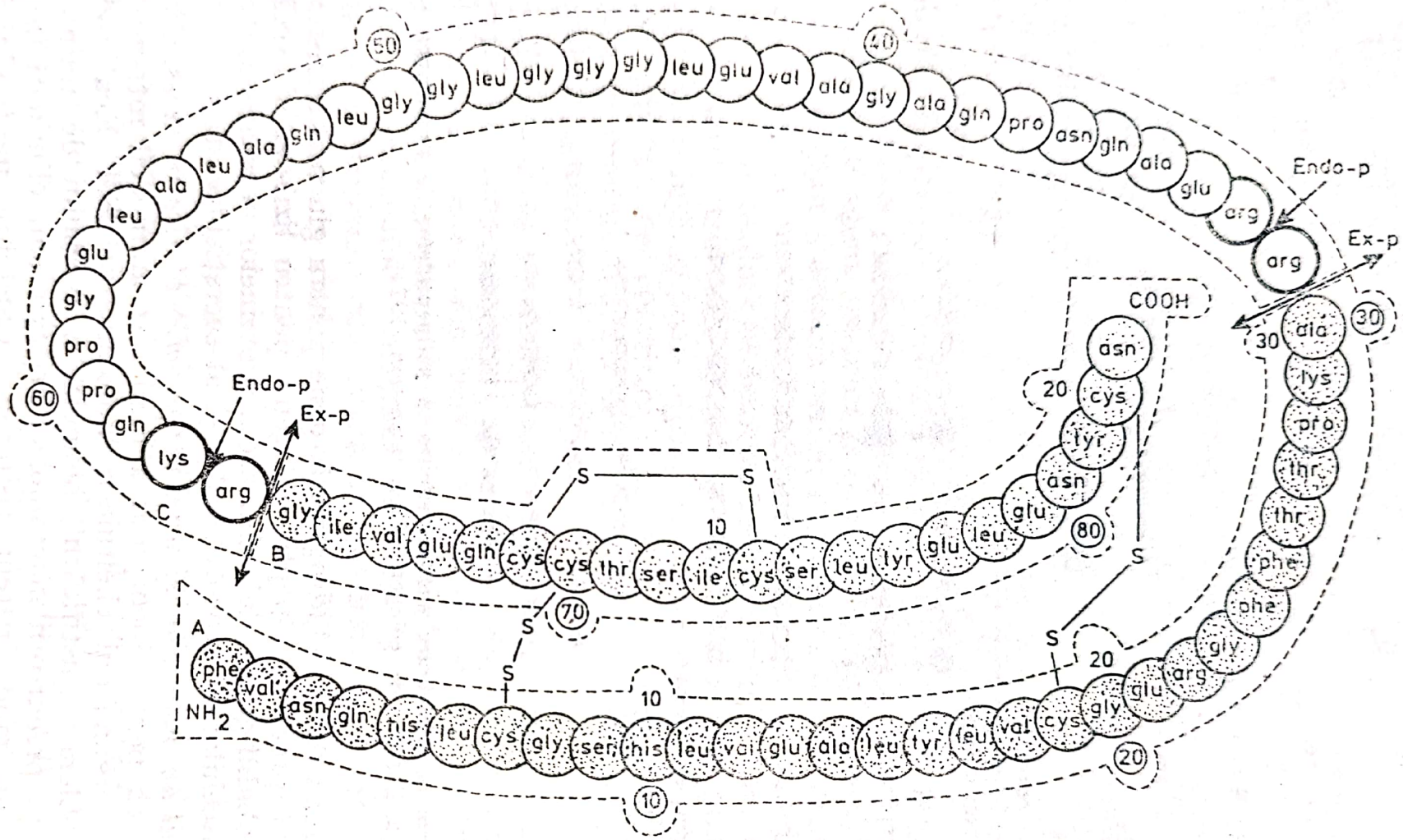


Fig. 57. Structura proinsulinei de porc în care se ilustrează segmentul C intermediar şi acţiunea peptidazelor de prelucrare (după Yost, 1972, cu modificări). Endo-p = endopeptidază; Ex-p = exopeptidază. Insulina matură cuprinde numai segmentele haşurate. (Cifrele încercuite indică poziţiile aminoacililor în proinsulină).

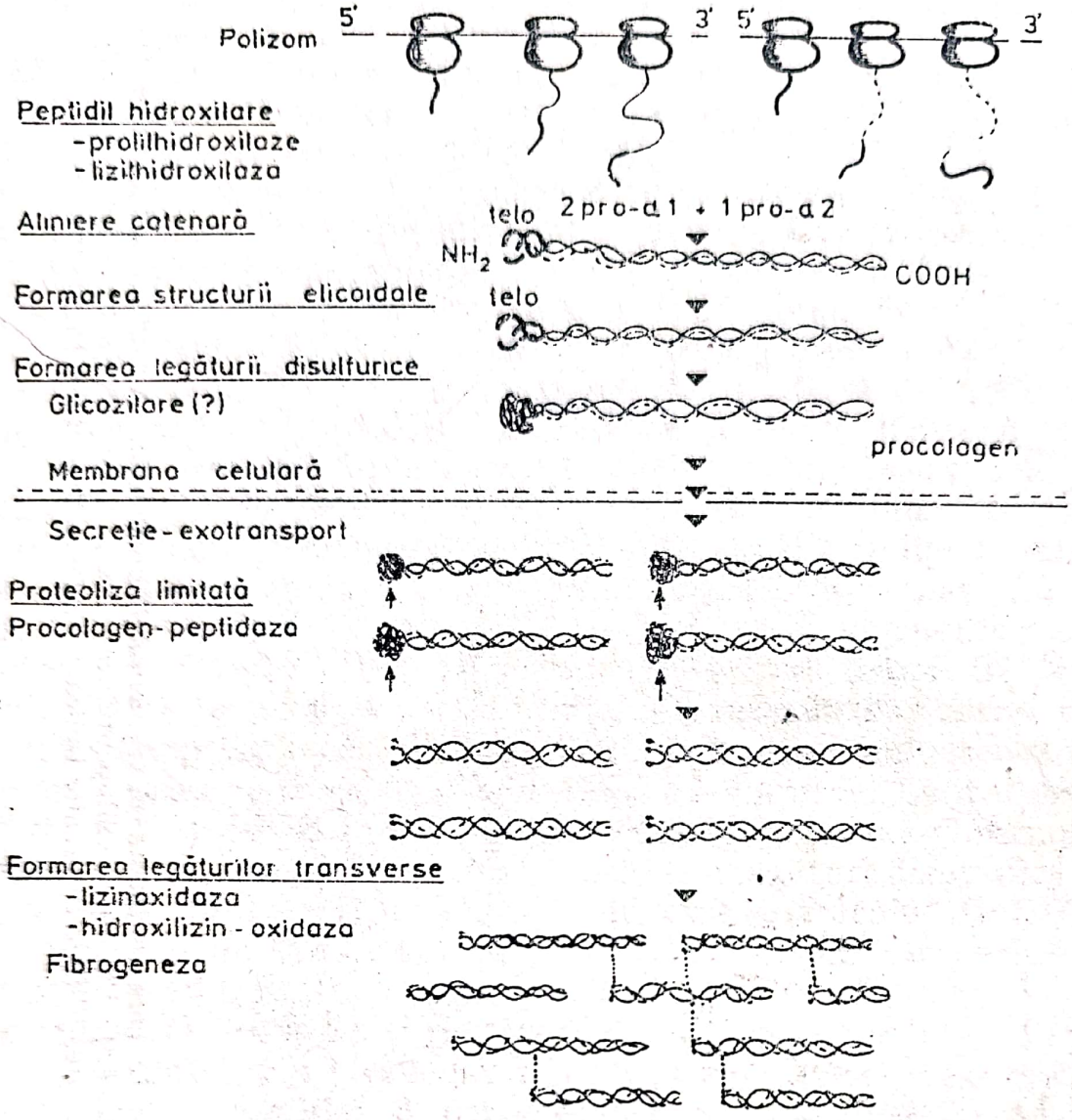


Fig. 58. **Etapele de prelucrare posttraduetoare a polipeptidelor de procolagen și formarea finală a fibrelor de colagen** (după Bornstein, 1974).

droxilază, gena de transhidrogenază, gene pentru glucozil-transferaze, gena pentru procolagen-peptidază, gena pentru lizil- și hidroxilizil-oxidază, probabil genele de codificare a proteinelor necesare în transportul transcelular al procolagenului și al secreției acestuia.

d) *Rostul aminoacizilor și segmentelor polipeptidice în exces.* Cunoscînd faptul că pentru încorporarea unui rest aminoacil într-un lanț polipeptidic organismul cheltuiește aproximativ 28,4 Kcal mol^{-1}, se pune problema „justificării" biologice a excesului de aminoacizi încorporați în precursorii macromoleculari care sînt eliminați în prelucrări într-un mod aparent risipitor. Existența metionilului la extremitatea amino a fiecărui lanț polipeptidic născînd ca expresie a mecanismului unic de inițiere a sintezei lanțurilor polipeptidice, clivarea lui sub acțiunea unei metionil-aminopeptidaze universale

Scanned with OKEN Scanner

sînt nmecanisme economicoase față de situația în care inițierea ar fi fost un proces specific pentru fiecare lanț polipeptidic. În acest caz, nu ar mai fi fost necesare nici încorporarea metionilului, nici metionil-exopeptidaza aminoterminală, dar ar fi fost necesară o diversificare enormă a întregului cortegiu de factori de inițiere. Fiecare factor ar fi fost necesar să fie de cel puțin 20 tipuri diferite în raport cu diversitatea posibilă a aminoacilului aminoterminal de la diferitele proteine. De aceea pentru diversitatea extremității amino, atît de necesară funcțiilor proteinice diferite, s-a fixat în filogeneză inițierea printr-un mecanism unic, încorporarea metionilului și apoi excizia lui tot printr-un mecanism unic universal, clivajul prin metionil-exopeptidaza aminoterminală. Segmentele telopeptidice ale polipeptidelor de colagen sînt necesare alinierii corecte a lanțurilor în elicoidul tricatenar iar segmentul C conectant din proinsulină asigură configurația necesară stabilirii structurii globulare și formării punților de disulfură. Experiențe efectuate *in vitro* au demonstrat că proinsulina ca și insulina pot fi desfășurate sub acțiunea ureii și a dimercaptoetanolului ca agent reductor care rupe legăturile disulfidice. Îndepărtarea agenților și aerarea permit restabilirea rapidă numai a proinsulinei; insulina nu poate fi refăcută. Restabilirea rapidă a formei globulare la proinsulină se datorează segmentului C care organizează steric formarea structurii terțiare și consolidarea prin punți de disulfură. În consecință, se poate afirma că energia cheltuită pentru sinteza segmentelor în exces constituie o parte din tributul plătit de organisme pentru organizarea nivelelor structurale superioare ale macromoleculelor proteinice.

e) *Stabilirea de structuri cuaternare.* Pentru agregarea lanțurilor polipeptidice corespunzătoare proteinelor oligo- și multimerice în structuri cuaternare, sînt necesare mai multe prerogative, printre care formarea structurii terțiare, desprinderea polipeptidelor din complexele polizomice, mobilizarea liberă a acestora în celulosol. Ca urmare, structura cuaternară se stabilește după etapa de terminare a traducerii și cînd lanțurile polipeptidice devin libere, capabile să fie mobilizate de curenții energiei libere și să aibă coliziuni moleculare. Agregările dintre lanțurile polipeptidice se realizează prin intermediul legăturilor nepeptidice fie necovalente, fie covalente. Acestea se stabilesc specific datorită regiunilor complementare formate de inflexiunile configurațiilor terțiare aprioric organizate. De exemplu, se formează suprafețe complementare de regiuni bogate în aminoacili amfipatici care dezvoltă legături apolare sau regiuni complementare care pot dezvolta legături dipol. În cazul proteinelor oligomere cu lanțuri polipeptidice identice agregarea are loc prin suprafețele complementare ale lanțurilor, pînă cînd acestea se suprapun reciproc. Proteinele oligomerice sau multimerice rezultate din agregarea de subunități identice sînt omogene.

Scanned with OKEN Scanner

Sînt numeroase proteine oligomere în alcătuirea cărora participă două subunităţi polipeptidice neidentice. Exemple ilustrative sînt lactic-dehidrogenaza şi hemoglobina. Ambele sînt tetrameri, dar modurile de agregare sînt diferite. În cazul dehidrogenazei, agregarea monomerilor se produce de la început la nivel tetrameric. Datorită configuraţiilor de suprafaţă şi coliziunilor intersubunitare întîmplătoare, cele două tipuri de subunităţi — denumite H şi M — formează cinci feluri diferite de tetrameri H_4, H_3M_1, H_2M_2, H_1M_3, M_4 într-o proporţie conformă desfăşurării binomului $(p + q)^4$ în care p = probabilitatea întîlnirilor subunităţilor H iar q = probabilitatea întîlnirilor subunităţilor M. Din această agregare eterogenă rezultă un polimorfism structural care se răsfrînge şi asupra proprietăţilor fizico-chimice (de exemplu, migrare electroforetică diferită şi separare în cinci benzi), cît şi asupra proprietăţilor funcţionale: fracţiunile mai bogate în lanţuri M exercită activitatea catalitică optimală în anaerobioză iar cele bogate în lanţuri H sînt mai active în aerobioză. Diferitele variante tetramere manifestă aceeaşi specificitate de substrat. Formele multiple moleculare care prezintă polimorfism fizico-chimic şi structural, dar au aceeaşi specificitate enzimatică se numesc izoenzime sau izozime. Numeroase enzime manifestă polimorfism izozimic ca expresie a secvenţei aminoacidice şi a genelor care le condiţionează producerea. Agregarea tetramerică de tipul hemoglobinei A umane are loc în două etape: întîi se formează unităţi dimerice alcătuite din lanţuri diferite de hemoglobină ($\alpha\beta$) şi secundar aceştia se unesc formînd numai structuri $\alpha_2\beta_2$. La agregările moleculelor de hemoglobină nu se întîlnesc în mod normal molecule de tipul $\alpha_1\beta_3$ sau α_4 sau $\alpha_3\beta_1$.

Proteinele multimerice se formează în general în etape succesive şi necesită intervenţia unor factori extrinseci secvenţelor aminoacidice ale monomerilor participanţi. Sînt descrise cel puţin trei tipuri de complexare. În primul rînd, agregarea multimerică dependentă de ligand şi formarea unui multimer cu activitate enzimatică unică. De exemplu, glutamic-dehidrogenaza este formată din subunităţi peptidice de 55 000 daltoni care alcătuiesc hexameri de 330 000 daltoni cu activitate enzimatică slabă; prin legarea substratului heptamerii se complexează într-un multimer de $1 \cdot 2 \times 10^6$ daltoni, forma enzimei cu activitate optimă. În al doilea rînd, agregarea multimerică formează agregate multienzimatice fizico-chimic unitare. De exemplu, se citează situaţia piruvic-dehidrogenazei, un complex cuboid cu greutatea moleculară de 4×10^6 daltoni, format din 90 de lanţuri polipeptidice, care manifestă trei activităţi enzimatice diferite. În al treilea rînd, stabilizarea moleculelor multimerice este realizată în unele cazuri cu ajutorul unui lanţ polipeptidic de consolidare care nu mai îndeplineşte şi alte funcţii multimerice. De exemplu, imunoglobulinele complexe aparţinînd claselor A şi M, la a căror structură

Scanned with OKEN Scanner

macromoleculară participă 2,3,4 sau 5 tetrameri L_2H_2, au în constituţia lor un polipeptid denumit J (de la cuvîntul englez *joint*) cu greutatea moleculară de 20 000 daltoni. Acesta are rolul de a solidariza tetramerii între ei.

2. *Agregări cu constituenţi neproteinici fie prin legare covalentă, fie necovalentă.* Legarea constituenţilor neproteinici denumiţi grupe prostetice este considerată un proces de finisare a proteinelor funcţionale, deoarece fără această etapă proteina respectivă rămîne afuncţională şi neparticipantă în expresia genică finală. Legarea constituenţilor neproteinici are următoarele posibilităţi de realizare: legarea covalentă prin substituţie sau adiţie; legarea necovalentă prin configuraţii sterice complementare.

a) *Legarea covalentă prin substituţie.* Din diversitatea de substituţii în care participă grupări prostetice, cele mai răspîndite sînt fosfatarea, N-acetilarea, legarea de glucide şi legarea covalentă a hemului. Fosfatarea este consecinţa activităţii enzimatice a fosfoglucotransferazelor şi a ATP-fosfotransferazelor. Primele transferă resturile fosforice activate de la diferiţi donori, ca glucoza 1,6-difosfat, la proteină esterificîndu-le cu oxidrilii liberi ai resturilor de serină sau tiroxină. ATP-fosfotransferazele transferă restul fosforic de la ATP la proteine legîndu-l de grupele aminate libere ale aminoacizilor bibazici. N-acetilarea constă din legarea covalentă de resturi acetil la grupările amino libere ale macromoleculei, fie la nivelul extremităţii amino a lanţurilor polipeptidice, fie la nivelul aminoacizilor bazici. Acetilarea se datorează efectului acetil-transferazelor sau acetochinazelor care transferă grupul acetil de la complexul acetil-coenzima A la proteină. Legarea glucidelor este cel mai divers şi mai răspîndit mecanism de finisare a proteinelor prin ataşare covalentă de substituenţi neproteinici. Marea diversitate rezultă din: structura extrem de eterogenă a grupărilor prostetice glucidice; tipurile de legături covalente care stau la baza complexării; diversitatea resturilor aminoacil participante ca reactanţi în procesul de legare. Din volumul imens de date referitoare la glicoproteine, cîteva aspecte mai importante pentru expresia genică se impun a fi luate în consideraţie. În primul rînd, grupările prostetice glucidice au mărimi variate, de la monozaharide la oligozaharide şi polizaharide. Resturile monoglucidice participante în grupările prostetice sînt de mare diversitate (glucoză, galactoză, fucoză, manoză, heptuloză, riboză, monoglucide aminate, monoglucide aminate şi N acetilate), mare parte necesitînd enzime specifice pentru sinteză. În al doilea rînd, legarea de proteine a oligozaharidelor, cel puţin pentru grupările glucidice cunoscute, are loc printr-o sinteză secvenţială a lanţului glucidic pe macromolecula proteinică şi nu prin sinteza extrinsecă a oligozaharidului şi apoi legarea lui la proteină. De aici rezultă necesitatea unor grupe de enzime cu specificitate pentru proteina de finisat. De exemplu, enzime pentru

Scanned with OKEN Scanner

glicozilarea proteinei din antigenele sistemului eritrocitar ABO, enzime specifice pentru glicozilarea colagenului, enzime pentru glicozilarea aloantigenelor HLA etc. În al treilea rînd, diversitatea enzimelor și factorilor de glicozilare și implicit a genelor care le codifică rezultă din numărul semnificativ de mare a resturilor aminoacil care dau derivați glucidici și implicit din tipurile de legături covalente care se formează primar la nivelul imediat al lanțului polipeptidic. De exemplu, în formarea primei legături glucidice, adiacentă lanțului polipeptidic, participă resturile încorporate ale următorilor aminoacizi: asparagina, serina, treonina, lizina, hidroxilizina, hidroxiprolina, cisteina, mai rar tirozina, arginina și histidina. Tot în scopul exemplificării se menționează în continuare cîteva tipuri de legături covalente formate între resturi aminoacil și glucide: legături de tip eter-oxid între hidroxilul fie al serinei, fie al treoninei, fie al tirozinei și un carbon hidroxilat al glucidului, adică legăturile O-glucidice; legături de tip N-glucidic cu participarea fie a grupării amida a asparaginei, fie a grupării amino a lizinei; legătura de tip sulfură între gruparea de sulfură a restului cisteinil și glucid (legătura S—D-galactozil, legătura S—D-glucozil). Legarea covalentă a hemului este întîlnită la citocromul c și constă din fixarea hemului prin două legături disulfidice realizate de două resturi din lanțul polipeptidic al citocromului.

b) *Legarea necovalentă prin configurații sterice complementare.* Dacă grupările prostetice legate covalent pot fi numite substituenți (substituie chimic fie un atom de hidrogen, fie o grupare funcțională din lanțul polipeptidic), grupările prostetice legate necovalent prin configurații tridimensionale complementare nu sînt substituenți pentru că nu substituie nimic. Legarea lor nu provoacă schimburi chimice ale lanțurilor polipeptidice, nu dau derivați care prin hidroliză să fie izolați ca resturi de-sine-stătătoare, așa cum sînt obținute resturi de fosfoserină din fosfoproteine sau resturi de N-acetil-lizină din acetoproteine. Grupările prostetice complementare se leagă la macromolecula corespunzătoare denumită apoproteină (apoenzimă, apo-lipoproteină), prin intermediul legăturilor de slabă energie fie de tip dipol-dipol, fie de tip apolar (ansambluri de forțe Van der Vaals). Fiecare proteină implicată în astfel de interacțiuni are situri de legare specifice pentru gruparea prostetică. Aceste situri constau din inflexiuni ale unor segmente din lanțurile polipeptidice care realizează o configurație în general cavitară (concavă) pe suprafața structurii globulare. Configurația sitului și potențialul de a forma legături necovalente sînt complementare grupului prostetic. De exemplu, situl de legare a hemului din hemoglobina A constă dintr-un repliu de 40 de resturi aminoacil al fiecărui lanț polipeptidic α sau β. Repliurile realizează situri cu profil cavitar potrivit steric hemului și denumit sugestiv de Lehmann (1968) „buzunar hemic" (engl. *haem pocket*).

Scanned with OKEN Scanner

Astfel de legături complementare necovalente prin situri sterice se întîlnesc frecvent în relaţiile dintre apoenzimă şi coenzimă, între enzimă şi legarea substratelor, la formarea lipoproteinelor. Mai sînt frecvent întîlnite în interacţiunile reglatorii ale sistemelor de modulare a sintezei proteinelor corespunzător cerinţelor metabolice, cît şi în interacţiunile dintre hormoni şi receptorii celulari specifici. În cazul lipoproteinelor circulante şi al complexelor lipoproteinice de membrană legăturile necovalente dintre grupările lipidice şi apo-lipoproteine constituie interacţiunile majore. Caracterul amfipatic al lipidelor permite pe de o parte dezvoltarea legăturilor dipol iar pe de altă parte, formarea de legături apolare, interacţiuni care stau la baza concepţiilor moderne referitoare la structura de membrană. În acest context este de reamintit că apolipoproteinele de membrană au în secvenţa aminoacidică o creştere importantă a numărului de aminoacizi hidrofobi de tipul izoleucinei, leucinei, valinei, fenilalaninei. Raportul de aminoacizi hidrofili/aminoacizi hidrofobi este de 1,4 la lipoproteine faţă de valoarea 1,7—2,1 observată la celelalte proteine. Bogăţia de aminoacili hidrofobi în secvenţă permite formarea de regiuni catenare apte să interacţioneze cu lipidele prin forţe apolare. Deşi legarea necovalentă a grupărilor prostetice nu are loc prin substituţie şi nu schimbă compoziţia chimică a lanţurilor polipeptidice, totuşi interacţiunile de la nivelul siturilor de legare induc modificări ale configuraţiei tridimensionale.

Macromoleculele globulare ale proteinelor au o structură de mare flexibilitate şi sînt într-o continuă stare pulsatorie manifestată prin desfăşurări catenare parţiale şi reînfăşurări. Această situaţie este numită „stare respiratorie moleculară" (engl. *molecular breathing*) prin analogie cu mişcările respiratorii continue. Starea pulsatorie continuă a proteinei este influenţată de prezenţa liganzilor specifici. Interacţiunea proteină-ligand schimbă unele constante fizico-chimice, printre care viteza de sedimentare ultracentrifugală, sensibilitatea la agenţii de disociere a subunităţilor, sensibilitatea la proteaze şi uneori migrarea electroforetică. De exemplu, glucoza descreşte sensibilitatea hexochinazei la tripsină iar adăugarea ARN la o soluţie de ribonuclează îi creşte acesteia rezistenţa la pronază.

2. **Degradarea continuă a proteinelor şi expresia genică.** Pînă nu de mult proteinele constitutive erau considerate destul de stabile, cu o frecvenţă de metabolizare scăzută, în aşa fel încît se considera că diviziunile celulare cu un ritm circadian permiteau transmisia acelorași proteine de-a lungul multor generaţii celulare. Stabilitatea proteinelor era considerată şi mai mare la celulele puternic diferenţiate, ca fibrele musculare, neuronii, hepatocitele. Cercetările recente au demonstrat fără ambiguitate că toate proteinele, inclusiv cele constitutive celulare, sînt degradate în aminoacizi liberi cu viteză

Scanned with OKEN Scanner

de metabolizare variabilă, dar mult diferită față de îmbătrînirea și moartea celulelor, chiar ale acelora cu un timp de viață mai limitat (limfocitele, eritrocitele, celulele epidermice, celulele epiteliale). Degradarea proteinelor este înțeleasă ca dezintegrare hidrolitică avansată care duce la descompunerea completă a lanțurilor polipeptidice pînă la aminoacizi sub acțiunea unor proteaze specifice acestui proces. Procesul este independent de prelucrarea polipeptidelor precursoare; pe cînd prelucrarea constituie parte integrantă din anabolism, degradarea proteinelor este parte definitorie a catabolismului. Degradarea proteinelor se caracterizează prin mai multe trăsături: a) Este un proces continuu de la care nu s-a constatat pînă acum nici o excepție; se desfășoară în toate etapele vieții; b) Are loc simultan cu sinteza de noi proteine de același fel cu cele catabolizate, cele două procese se află într-un echilibru dinamic; c) Dezintegrarea proteinelor studiate (au fost studiate mai mult enzimele) se produce la întîmplare, cuprinde toate moleculele, noi și vechi, și este o reacție cu o cinetică de prim ordin; nu este asemănătoare în consecință cu ciclul de viață al celulelor sau organismelor. Cu alte cuvinte, dezintegrarea nu este o consecință a „îmbătrînirii" proteinelor; d) Viteza de metabolizare a diferitelor proteine (nivelul de *turnover*) variază în limite foarte mari pentru același țesut. De exemplu, proteinele hepatice la șobolan au un timp mediu de înjumătățire de 3,5 zile; urmărite individual, timpul de înjumătățire variază de la 11 minute pentru ornitin-decarboxilază pînă la 19 zile pentru LDH_5; e) Viteza de metabolizare poate fi variabilă pentru lanțurile polipeptidice ale aceleiași enzime. Aceasta s-a dedus din degradarea izozimelor cu lanțuri polipeptidice diferite ale enzimelor oligomerice, ca lactat-dehidrogenaza (LDH); f) Proteinele constituente ale unui organit au viteze de degradare eterogenă, așa cum s-a constatat pentru proteinele cromozomale, ribozomale și pentru proteinele miofibrilei. Peroxizomii de la nivelul ficatului constituie o excepție, sînt organitele care se degradează unitar; g) Proteinele anormale produse prin procese mutaționale sau prin alterări în traducere induse de factori extrinseci se degradează mai rapid decît cele normale. Diferențele de degradare între proteinele anormale și cele normale corespunzătoare se datoresc modificărilor conformaționale ale primelor; h) Viteza de degradare variază cu condițiile fiziologice sau patologice. De exemplu, degradarea proteinelor constitutive ale miofibrilei striate este influențată de aportul nutritiv, de nivelul de insulină, de denervare, de nivelul activității contractile; i) Viteza de degradare este direct proporțională cu mărimea lanțurilor polipeptidice și mărimea moleculei întregi de proteină, cu alte cuvinte viteza de degradare este cu atît mai rapidă cu cît proteina are o moleculă mai mare; j) Aceeași proteină se degradează diferit în raport cu țesuturile în care se află, constatare explicată prin diferențele în condițiile locale (cantitatea inegală de liganzi

Scanned with OKEN Scanner

specifici, știut fiind că aceștia scad viteza de degradare), cantitatea inegală de proteaze, stările funcționale diferențiate; k) Agenții degradativi sînt proteaze de tip endopeptidazic cu activitate optimă la pH neutru și sînt diferite de peptidazele de prelucrare și de proteazele lizozomale. Multe constatări experimentale pledează pentru un sistem proteolitic unic iar diferențele degradative sînt date de proprietățile moleculare și funcționale ale proteinelor, cît și de condițiile tisulare locale. Totuși au fost demonstrate și sisteme proteolitice specifice pentru grupe funcționale de proteine. De exemplu, au fost izolate proteaze care dezintegrează selectiv enzimele dependente de piridoxalfosfat și proteaze specifice enzimelor NAD-dependente. Descrierea succintă a numai unsprezece trăsături care definesc procesul degradativ continuu al macromoleculelor informaționale proteinice, deși nu redă toată complexitatea acestui proces general, indică implicațiile lui profunde în expresia genică. Degradarea proteinelor este un mecanism de delimitare a expresiei genice la un echilibru cantitativ, intervine în amplitudinea de exprimare a mutației unei gene care induce formarea unei proteine modificate, corectează erorile de codificare prin dezintegrarea mai rapidă a polipeptidelor eronate, intervine în procesele modulării activităților proteinice prin interrelație cu efectul liganzilor, este un factor de interrelație între nivelul expresiei genice și condițiile de mediu.

3. Caracterul multigenic al expresiei genice și finisarea caracterelor complexe ca etapă distinctă a transferului informațional. În contextul expresiei genice se impunea abordarea descriptivă a prelucrărilor posttraductoare și a echilibrului dinamic dintre sinteză și degradare. Interconectarea lor logică ilustrează complexitatea expresiei genice. În explicarea relațiilor genice corespunzătoare structurilor și funcțiilor moleculare, se utilizează adesea expresia laconică „gena X codifică proteina X" și în majoritatea cazurilor înțelesul este limitat la principiul central al biologiei exprimat prin relația de transfer informațional ADN→ARN→proteină. Acest raționament este important în conceperea și interpretarea sistemelor-model care au ca scop analiza de amănunt a genelor corespunzătoare diferitelor proteine. Oricum, progresele mari ale fiziologiei și biochimiei solicită geneticii explicații referitoare la funcții și disfuncții complexe, măsura în care mecanismele moleculare ale geneticii sînt relevante pentru caracterele multifactoriale a căror expresie genică este influențată semnificativ de factorii de mediu. Explicarea componentei genetice privind aceste caractere este de mare interes fie pentru înțelegerea dezvoltării și diferențierii organismelor, fie pentru patogeneză bolilor cu largă răspîndire, fie pentru ameliorarea speciilor de importanță economică. Complexitatea prelucrărilor posttraductoare ale lanțurilor polipeptidice în finisarea proteinelor funcționale face parte

Scanned with OKEN Scanner

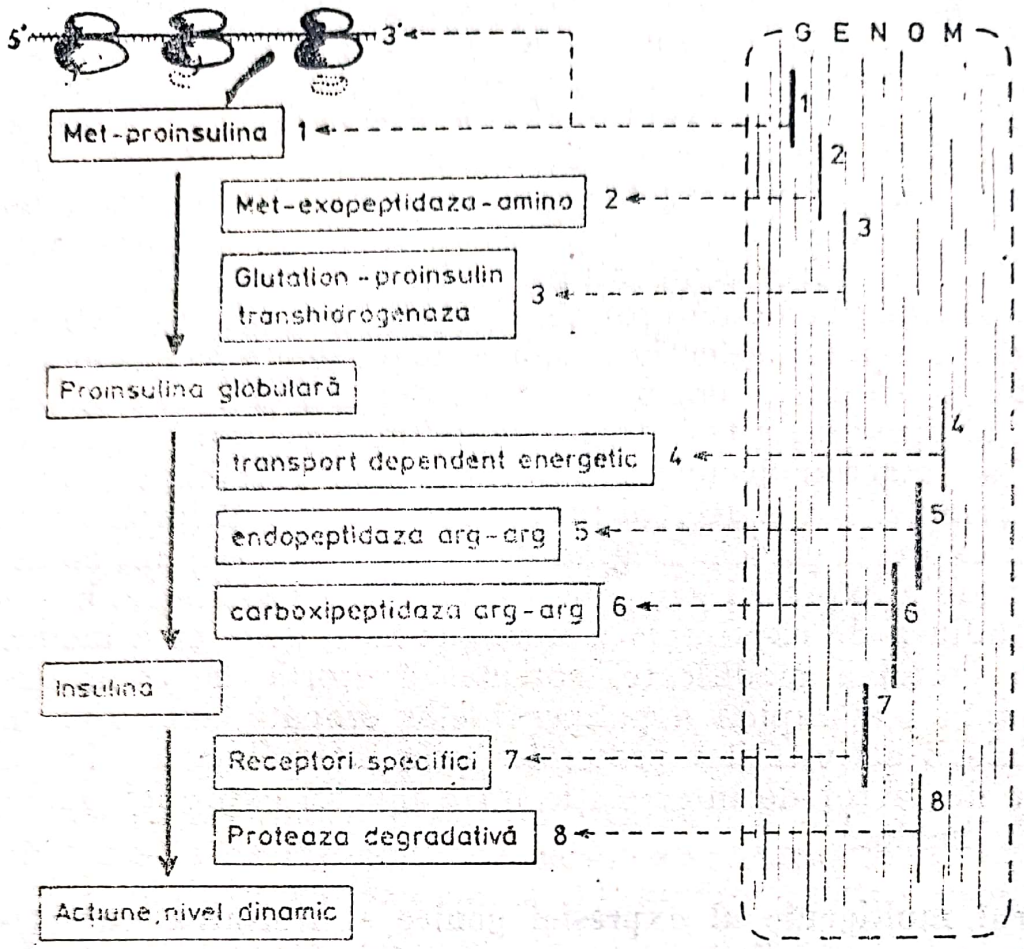


Fig. 59. **Ilustrarea complexului genic neunitar dispers necesar producerii de insulină matură şi nivelul dinamic de acţiune insulinică,** făcîndu-se abstracţie de alte produse genice de interacţiune din reglajul neurohormonal. În dreapta este figurat genomul uman în care sînt reliefate genele participante direct în activitatea insulinei finisate (nu este specificată starea de sintenie cromozomală).

din ultima treaptă a conversiunii informaţiei genetice în caractere fenotipice. Nivelul acestei trepte, unde produsele mai multor gene concură la finisarea unei proteine funcţionale, constituie nivelul prioritar, de răscruce, care poate fundamenta baza moleculară a caracterelor poligenice, la a căror expresie cel mai adesea participă şi ambianţa externă (ecologică). Pentru a ilustra această consideraţie, reluăm exemplul producerii de insulină şi căile sale de acţiune celulară. Fiecare factor de maturare insulinică reprezintă un produs al unei gene : gena pentru metionil-exopeptidaza aminoterminală, gena pentru glutation-insulin-transhidrogenază, gena pentru endopeptidaza-arg-arg, arg-lys-insulinică (fig. 59). Neluînd în considerare şi factorii de transport secretor, pentru acţiunea insulinei şi timpul ei de înjumătăţire sînt esenţiali şi produşii genelor pentru receptorii insulinici celulari de membrană şi gena (sau genele) de protează hepatică degradativă. Astfel, pentru insulina matură şi menţinerea ei

Scanned with OKEN Scanner

dinamică drept efector al metabolismului intermediar, sînt necesare funcțiile de codificare a cel puțin opt gene diferite, din care cel puțin patru sînt specifice. Ca urmare, una dintre cele mai simple proteine codificată de genomii organismelor are o expresie poligenică. În prezent, se poate afirma că majoritatea proteinelor au o expresie genică analoagă insulinei, adică o specificare poligenică. Din diferitele căi ale prelucrărilor care interesează finisarea proteinelor funcționale și dinamica lor de acțiune rezultă existența unei organizări analoage cu o succesiune asemănătoare de etape.

Participarea multigenică la expresia finală a unei proteine funcționale contravine aparent cu concepția potrivit căreia există caractere monogenice și caractere poligenice. Dacă expresia genică, chiar și a unei proteine singulare, este poligenică, se poate explica atunci justețea desemnării caracterelor ereditare monogenice cu această denumire? Datele recente care opinează pentru participarea multigenică în finisarea unei proteine funcționale nu sînt în discordanță cu modul clasic de a înțelege raporturile numerice dintre gene și caractere. Denumirile monogenice și poligenice se referă la modalitatea de transmisie ereditară și concentrare familială, și nu la mecanismele ontogenice ale expresiei genice. Descoperirea participării multigenice în expresia informațională a unei proteine nu anulează concepția defectului monogenic, ci permite aprofundarea mecanismelor patogene ale bolilor ereditare, aduce noutatea de a aborda molecular studii monogenice în ansamblul poligenic al exprimării proteinelor. De exemplu, cunoașterea enzimelor de prelucrare și degradare permite lămurirea unor defecte considerate mai înainte ca fiind situate la nivelul genelor structurate pentru lanțurile polipeptidice (cap. XI).

Expresia genică a unei funcții devine un ansamblu de interconectări, o mulțime topologică, în care fiecare element al mulțimii este produs al codificării înțeleasă prin relația ADN → ARN → proteină. La acest nivel, capacitățile multifuncționale ale proteinelor aflate în interacțiune elaborează constantele fizico-chimice, structuralizează celulele, sintetizează compușii neproteinici conform specificităților funcționale determinate de secvențele specifice de aminoacizi. Cu alte cuvinte, proteinele sînt macromoleculele care transferă informația genetică la nivelul funcțiilor și structurilor finalizate ale organismului. Modulările cantitative ale activității proteinelor, reglarea cantitativă și temporală a sintezei de proteine, diferențierea, constituie alte nivele într-un ansamblu complex, aflat încă în stadii de elucidare.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul X

CONTROLUL CANTITATIV ŞI PROGRAMAREA EXPRESIEI GENICE ÎN ADAPTARE ŞI DIFERENŢIERE

În conformitate cu modurile de organizare şi sinteză ale macromoleculelor informaţionale, cît şi ale prelucrărilor din procesele de maturare funcţională (cap. III — IX), fiecare macromoleculă constituie un caracter complex a cărui exprimare este asigurată de gene corespunzătoare. De la această regulă nu fac excepţie nici segmentele de ADN (genele). Genomul (masa de ADN al unui aparat genetic) este prin urmare un caracter complex codificat de genele care produc prin transfer informaţional ADN-polimeraze, ligaze, endonucleaze, topoizomeraze (enzime destabilizatoare ale structurii dublu-elicoidale) şi alţi factori care participă la sinteza ADN (sinteza genomului) şi la organizarea lui cromozomală. Astfel, expresia genică este eterogenă şi cuprinde înseşi genele care sînt în orice moment componente informaţionale (cap. I) ale ciclului macromolecular angajat în transferul informaţional (cap. II). Nu ar fi exagerat dacă segmentele mobilizabile de ADN de tipul transpozonilor (cap. XIII) ar fi considerate ca produse sau factori de prelucrare a genomului. De exemplu, reacţiile de desprindere a unui transpozon au analogii cu desprinderea segmentului C din proinsulină în prelucrarea insulinică.

Expresia genică are o diversitate calitativă, a cărei amploare este variabilă în funcţie de complexitatea genomică a fiecărui organism. Din desfăşurarea ciclului de viaţă a diferitelor forme de organizare a materiei vii, de la virusuri pînă la eucariotele superioare, rezultă că proteinele şi caracterele complexe care alcătuiesc diversitatea expresiei genice nu sînt codificate dintr-odată. Activitatea mai multor proteine (mai ales enzimele), cît şi sinteza lor sînt condiţionate de influenţele factorilor de mediu, iar codificările proteinelor diverse au loc după un program temporal. Astfel, în conformitate cu teoria generală a informaţiei, diversitatea este o calitate a informaţiei genetice care face posibilă acţiunea sistemică a operativităţii, a deciziei selective, a organizării şi programării. Acestea acţionează asupra diversităţii potenţiale a transferului de informaţie şi triază în limitele genomice ale organismului regiunile genetice ce se impun a fi exprimate, fie în diferitele etape de dezvoltare, fie în diverse condiţii ecologice. Rela-

Scanned with OKEN Scanner

ţia directă dintre diferitele specialităţi, ca informaţia, decizia, analiza operaţională, programarea, formulată în teoria sistemelor, se manifestă în sistemele de control cantitativ al expresiei genice. De aceea, aplicarea acestor relaţii a început să dea rezultate valoroase încă din epoca de pionierat a geneticii moleculare, cînd s-au descoperit mecanismele *feed-back* drept sisteme de control în sinteza aminoacizilor (Umbarger, 1956) şi în sinteza nucleotidelor pirimidinice (Yates şi Pardee, 1956). Consacrarea definitivă în genetică a teoriilor matematice de control al transferului informaţional a fost realizată de Jacob şi Monod (1961) care au fundamentat experimental modelul operon al reglării genetice cantitative în sinteza de proteine. Ca şi în informaţia genetică, aplicarea celorlalte specialităţi ale teoriilor de sistem a condus la utilizarea unor termeni din fizico-matematică în desemnarea funcţională de structuri biologice şi circuite biochimice. De exemplu, *feed-back*, operator, operon, circuit *feed-back*, programare, decizie binară sînt utilizate în contextul geneticii moleculare şi dobîndesc semnificaţii specifice domeniului biologic.

1. Nivelele de control şi gradul lor de generalizare. În prezent, marea diversitate de date referitoare la controlul (reglarea) expresiei genice au conturat numeroase trăsături generale, cît şi particularizări pentru diferite grupări taxonomice, după cum urmează.

1) *Controlul cantitativ se exercită la toate nivelele de transfer al informaţiei genetice.* Fiecărui nivel i s-au descris sisteme de reglare cantitativă: reglarea transcrierii diferitelor categorii de ARN, mecanisme de control ale prelucrărilor de precursori ARNm şi de transport al acestora la nivelul sediilor de traducere, controlul reacţiilor implicate în sinteza proteinelor la nivelul traducerii, controlul activităţii proteinelor, controlul nivelului cantitativ al proteinelor prin degradare continuă. Deoarece activităţile specifice ale proteinelor sînt incluse în transferul de informaţie pînă la finalizarea caracterelor complexe, se înţelege de la sine că şi reglarea acestor activităţi face parte din controlul expresiei genice.

2) *Acţiunea factorilor de control este în mod obişnuit localizată în prima etapă a proceselor biochimice complexe sau proceselor biologice.* Marea majoritate a reacţiilor biochimice complexe au o evoluţie ciclică. Acestea încep printr-o etapă de iniţiere (sinteza primului precursor al unui aminoacid, sinteza primului precursor al unui nucleotid, încorporarea primului aminoacid într-un lanţ polipeptidic, încorporarea primului nucleotid într-o catenă de acid nucleic). Se continuă cu etape intermediare şi sfîrşesc cu o etapă caracterizată fie prin formarea produsului final (aminoacid, nucleotid), fie prin terminarea sintezei unei macromolecule. Şirul de etape reacţionale într-un proces de sinteză se desfăşoară unidirecţional şi în cascadă, adică primul precursor condiţionează formarea celui de-al doilea, cel de-al doilea condiţionează pe al treilea. Interacţiunile de control se exercită de obicei

Scanned with OKEN Scanner

la nivelul primei etape reacționale iar modificările cantitative ale acesteia se repercutează și asupra celorlalte etape datorită caracterelor ciclic și de cascadă.

3) *Viteza de răspuns în schimbările cantitative ale diferitelor nivele de control este inegală și cu atît mai rapidă, cu cît circuitul reacțiilor biochimice interesate este mai scurt iar produsul final este mai simplu.* Controlul cantitativ al activității unei proteine sau al unei căi din metabolismul intermediar se desfășoară în perioade scurte de timp și permite un răspuns imediat la influența specifică exercitată de un factor de mediu (Umbarger, 1964). Răspunsul cantitativ este progresiv mai lent cînd controlul se referă la sinteza de macromolecule, proteine, ARN și mai ales ADN.

4) *Controlul expresiei genice are pînă la nivelul traducerii un mecanism de modulare iar la nivelul transcrierii și replicării, fie mecanisme de inducție-represie, fie mecanisme de activare-inactivare genică.* Prin modulare se înțelege o modificare a nivelului cantitativ de expresie genică, privind fie activitatea proteinelor, fie sinteza proteinelor la nivelul traducerii. Modificarea activității proteinelor este reversibilă și condiționată de acțiunea unor factori de mediu extern sau intern.

La nivelul transcrierii fenomenele de inducție și represie, legate de obicei de sinteza de ARNm instabil, controlează sinteza de proteine prin sistemul operon de reglare.

Activarea și inactivarea genică sînt procese stabile care vizează atît transcrierea, cît și replicarea, sînt legate de succesiunea temporală a expresiei genice și proliferărilor celulare. Activarea genică este legată de procesele specializării celulare la eucariotele multicelulare și este relativ independentă de condițiile de mediu. Activarea și inactivarea constau din procese de deblocare și respectiv blocare funcțională, selectivă și stabilă a genelor, prin proteine și alți factori specializați. Mecanismele lor fac parte din programarea expresiei genice în diferențiere. În literatură se pot întîlni situații în care termenii modulare, represie, derepresie, activare sînt amalgamat înlocuiți unul cu altul.

5) *Gradele de generalizare și de suprapunere ale diferitelor modalități de control al expresiei genice.* Atît modulările activității proteinelor, cît și inducția și represia sintezei de enzime au fost descrise ca mecanisme de control intracelular la toate viețuitoarele și constituie baza moleculară a adaptării la condițiile variate ale mediului. La eucariotele multicelulare, specializarea din diferențiere, homeostazia mediului intern și integrarea neurohormonală determină ca înseși procesele bazale de modulare și inducțierepresie să dobîndească un alt nivel de organizare.

6) *Mecanismul molecular de interacțiune la diferite nivele de control cantitativ este adesea mecanismul alosteric.* Tabloul sinoptic al nivelelor de control cantitativ schițat în această secțiune constituie o uvertură la descrierile mai amănunțite despre alosterism, modulările din activitatea proteinelor și căilor metabolismului intermediar, inducția și

Scanned with OKEN Scanner

represia în codificarea genică. Delimitarea între termeni pe baza progreselor în studiul expresiei genice va permite o subliniere mai clară a mecanismelor de cuantificare din adaptare și diferențiere, mecanisme complicate și încă incomplet lămurite.

2. **Mecanismul alosteric și interacțiunile dintre macromolecule.** Concepția alosterică a fost sugerată de descrierea inhibiției prin produs final a sintezei de aminoacizi. Deoarece aminoacidul inhibitor și substratul enzimei inhibate nu au aceeași configurație sterică, nu sînt izosterici, ci alosterici (gr. *allos* = altul, *stereos* = spațiu), atunci Monod și Jacob (1961) au propus termenul de mecanism alosteric pentru acest fenomen de inhibiție. Numeroase studii fizico-chimice privitoare la modificările tridimensionale ale proteinelor oligomerice și multimerice aflate în procesul de exercitare a funcțiilor specifice au precizat că schimbările de activitate sînt concomitente cu modificări ale conformației spațiale. Schimbările conformaționale sînt prezente atît la enzimele interesate în inhibiția prin produs final, cît și la alte enzime sau proteine neenzimatice. Astfel de schimbări conformaționale au fost observate și cel mai amănunțit studiate la hemoglobină. Modificările conformaționale sînt induse și de substrat. În general, proteinele susceptibile la schimbări conformaționale au mai multe situri de legare fie pentru substrat, fie pentru alți compuși care se leagă în situri alosterice. Toți compușii care se leagă specific, reversibil și obișnuit necovalent de proteine, provocînd prin această legare o schimbare conformațională tranzitorie, sînt numiți liganzi. Cu termenul de ligand sînt desemnate substratele, coenzimele, cofactorii activatori sau inhibitori ai activității proteinelor, ca ionii metalici, cofactorii energetici, macromoleculele (ARN și ADN).

Termenul de alosterie nu s-a mai referit numai la structura diferită a liganzilor, ci și la legarea lor în situri diferite (alosituri) situate în regiuni diferite ale macromoleculei proteinice, chiar dacă acele situri interacționează cu același ligand. În această conjunctură mecanismul alosteric a fost definit ca o modificare a activității specifice a unei proteine concomitentă unor schimbări conformaționale tranzitorii care cuprind întreaga macromoleculă (tranziții alosterice) provocate de atașarea unui ligand în situl său specific.

1. *Componentele mecanismului alosteric; efecte alosterice.* Mecanismul alosteric rezultă din interacțiuni moleculare iar structurile participante drept componente ale acestor interacțiuni sînt următoarele: proteinele alosterice, liganzii și liganzii macromoleculari cu siturile proprii de recunoaștere. Proteinele alosterice sînt oligomerice sau multimerice, au structură globulară cuaternară în care subunitățile sînt asociate în unitatea moleculară prin legături necovalente. Siturile specifice pentru fiecare ligand sînt în general tot atîtea cîte subunități are molecula proteinică raportată, sînt structural separate între ele, iar atașarea unui ligand într-un sit produce modificarea reactivi-

Scanned with OKEN Scanner

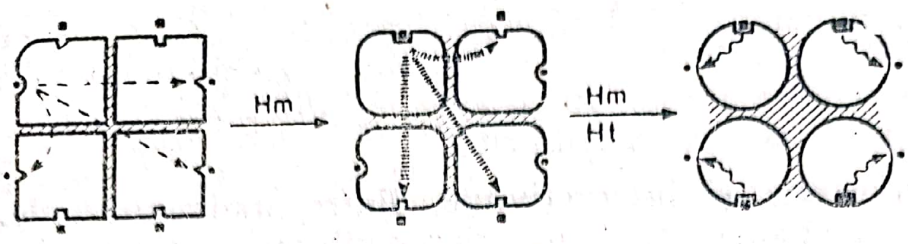


Fig. 60. **Reprezentarea grafică a unei enzime tetramerice** în care pătratele şi cercurile sînt subunităţi în variate stări conformaţionale. ● = substrat; ■ = ligand alosteric faţă de substrat; săgeata întreruptă reprezintă inducţia tranziţiilor homotrope la siturile de substrat. Celelalte săgeţi indică interacţiuni homo- şi heterotrope descrise în text. Hm = efect alosteric homotrop. Ht = efect alosteric heterotrop.

tăţii celorlalte situri cu liganzii corespunzători. Această schimbare concertată a capacităţii de reactivitate a siturilor este numită efect alosteric. Datorită interacţiunilor multiple şi diferite dintre situri fie identice, fie diferite în tranziţiile alosterice induse de liganzi identici ori diferiţi, Monod şi colab. în 1965 au împărţit efectele alosterice în două categorii: a) efecte alosterice homotrope datorite interacţiunilor provocate de liganzi identici; de exemplu, tranziţiile alosterice ale hemoglobinei induse de legarea oxigenului molecular; b) efecte alosterice eterotrope care constau în modificări ale activităţii unei enzime prin interacţiune între liganzi diferiţi; de exemplu, schimbarea vitezei de legare a substratului în siturile active ale unei enzime reglatoare datorită legării efectorului alosteric în siturile alosterice propriu-zise. Ca urmare a acestei clasificări şi siturile alosterice pot fi împărţite în situri alosterice homotrope şi situri alosterice eterotrope (fig. 60). Liganzii au specificitate pentru proteinele cu care interacţionează. Depinzînd de complexitatea reacţiei în care participă o proteină, liganzii corespunzători acesteia pot fi variaţi ca număr şi structură. De exemplu, hemoglobina are ca ligand oxigenul molecular, aspartat-transcarbamilaza are ca liganzi acidul aspartic, carbamil-fosfatul şi ribonucleotidele pirimidinice. Liganzii sînt de mărime diversă în funcţie de specificitatea funcţională a proteinei. La enzimele participante în căile metabolismului intermediar de sinteză a aminoacizilor sau a nucleotidelor, liganzii corespunzători sînt micromolecule. Enzimele participante în sinteza proteinelor şi acizilor nucleici au liganzi de mărime diversă. De exemplu, AA-ARNt-sintetaza (cap. VIII) are ca liganzi un aminoacid, o moleculă de ATP şi o macromoleculă de ARNt. Represorul din sistemul operon al lactozei are ca liganzi lactoza sau analogi ai acesteia şi cromozomul de *E.coli*. Liganzii macromoleculari sînt atît de imenşi, încît depăşesc adesea mărimea proteinei alosterice corespunzătoare, de aceea interacţiunea are loc numai între situl alosteric de pe suprafaţa proteinei şi un segment de ligand denumit sit de recunoaştere. De exemplu, din molecula de ADN care constituie cromozomul bacilului coli numai segmentul operator al operonului lac este situl de recunoaştere a represorului lac. În general,

Scanned with OKEN Scanner

mecanismul alosteric poate să incrimineze numai proteine cu structuri cuaternare (Monod și colab., 1965, Rieger și colab., 1976). Sînt însă proteine monomere globulare care, angrenate tranzitoriu sau stabil în complexe funcționale structural unitare, pot avea tranziții conformaționale asemănătoare proteinelor oligomerice (de exemplu, ribozomii și factorii din sinteza proteinelor). O proteină alosterică dată împreună cu liganzii specifici pentru acea proteină formează substratul molecular al mecanismelor alosterice.

2. *Tipuri de mecanisme alosterice.* În raport cu structura liganzilor și a siturilor specifice de interacțiune, mecanismele alosterice pot fi homotrope și mixte, eterotrope-homotrope. Dacă mecanismele homotrope pot fi și simple, mecanismele eterotrope sînt totdeauna asociate cu o componentă de interacțiune homotropă. Mecanismele alosterice mixte homo-eterotrope sînt cele mai numeroase, deoarece majoritatea enzimelor au, pe lîngă substrate, diferiți cofactori (ioni metalici, coenzime, cofactori energetici) și toți la un loc constituie o eterogenitate de liganzi.

Efectele alosterice pot fi pozitive sau negative. Sînt pozitive cînd schimbările conformaționale induse de legarea unei molecule de ligand măresc viteza de legare a ligandului următor și-i întăresc legarea. Sînt negative cînd atașarea unui ligand scade viteza de legare și blochează interacțiunea altui ligand. Efectele alosterice pozitive au mai fost numite cooperante iar cele negative antagoniste. Tranzițiile eterotrope dintr-un sistem alosteric mixt sînt, în funcție de proteina alosterică, fie negative, fie pozitive. Tranzițiile homotrope din sistemele mixte sînt însă numai pozitive. Reluînd exemplul căii de biosinteză a triptofanului, sistemul alosteric de control al acestei căi este format din antranilat-sintetază (proteină alosterică) și liganzii săi specific: acidul chorismic și glutamina ca substrate și triptofanul ca produs final inhibitor. Legarea primei molecule de substrat crește viteza de legare în celelalte situri homotrope iar tranzițiile alosterice sînt pozitive. Legarea triptofanului are două efecte: a) un efect homotrop pozitiv, deoarece legarea primei molecule de aminoacid grăbește viteza de legare a celorlalte atașări de aminoacid în siturile corespunzătoare; b) un efect eterotrop negativ, deoarece legarea triptofanului încetinește legarea substratelor și scade pînă la anulare sinteza antranilatului (fig. 60). În toate mecanismele alosterice tranzițiile homotrope par a fi numai pozitive fie în sistemele mixte, fie în sistemele homotrope. Reluînd exemplul hemoglobinei, aceasta constituie cu ligandul său, oxigenul molecular, un model de mecanism homotrop în care tranzițiile alosterice sînt numai pozitive (agoniste și nu antagoniste).

3. *Natura interacțiunilor ligand-proteină alosterică.* Tranzițiile alosterice sînt modificări tranzitorii ale proteinelor și în numeroase cazuri nu produc modificări chimice ale liganzilor legați, atașarea acestora în siturile specifice are loc prin intermediul forțelor necovalente.

Scanned with OKEN Scanner

Totuși, datorită faptului că substratele, coenzimele, cofactorii energetici sînt tot liganzi alosterici iar aceștia sînt modificați chimic în timpul procesului de complexare, este necesar să se distingă două stadii deosebite ale interacțiunii ligand-proteină: a) *Recunoașterea ligand-proteină alosterică* este stadiul primordial al interacțiunii și constă dintr-un proces de selectare sterică a ligandului din amestecul de compuși ai celulosolului și atașarea concomitentă în situl specific. Acest stadiu a fost definit și delimitat în numeroase cazuri în care există analogii sterice între liganzi aparținînd la enzime diferite. Un exemplu îl constituie tipurile diferite de ARNt și AA-ARNt-sintetaze (cap. VIII). Asocierea de liganzi analogi are constante mai apropiate valoric decît reacția de modificări chimice. Recunoașterea este un proces comun tuturor liganzilor și este stadiul declanșator al tranzițiilor alosterice; b) *Stadiul producător de modificări chimice* urmează recunoașterii și are loc mai ales în cazul substratelor și cofactorilor participanți în modificările chimice catalizate de enzimă. Un exemplu prin care s-a delimitat acest de-al doilea stadiu de cel precedent de recunoaștere îl constituie interacțiunea dintre tripsină și formele D și L ale benzil-arginil-etil esterului (Hélène, 1977). Constanta de asociere a celor doi izomeri la enzimă este aceeași, dar hidroliza produsă de tripsină este de 80 000 de ori mai rapidă pentru forma L decît pentru forma D. Din cele două stadii ale interacțiunii ligand-proteină, stadiul de recunoaștere, „de legare cognitivă", este cel important pentru efectele alosterice. În cazul alosteriei pozitive, legarea cognitivă a unei molecule de ligand favorizează la distanță legarea cognitivă a altei molecule de ligand în alt sit homo- sau eterotropic. În alosteria negativă influențele alosterice sînt inverse: legarea cognitivă a unui ligand eterotrop induce modificări care scad și anulează capacitatea cognitivă a siturilor active.

Tipurile de interacțiuni implicate în asocierile ligand-sit alosteric sînt forțele de slabă energie sau legăturile necovalente: legături dipol (de hidrogen și ionice) și legăturile apolare formate din grupe de forțe Van der Waals (cap. II și IX). Alături de aceste forțe de slabă energie descrise clasic în asocierile moleculare, mai sînt menționate două tipuri de interacțiuni care pot îndeplini rolul de „punți" de atașare între ligand și proteină: interacțiuni mediate prin ioni metalici și legăturile de stivuire sau de intercalare (Toulmé și colab., 1974, Hélène, 1977). Ionii metalici de magneziu, calciu, potasiu, zinc sînt de mult implicați în calitate de cofactori a numeroase enzime, cu capacitatea de a crește viteza de saturare a enzimelor în interacțiunile de asociere a liganzilor. Prin sarcinile lor reziduale și prin capacitatea lor de a stabiliza complexe ternare proteină-metal-liganzi, sînt considerați factori importanți de mediere în asocierile liganzi-proteine alosterice. Legăturile de stivuire sau de intercalare constau din stabilirea de forțe de atracție prin suprapunerea repetată în formă de

Scanned with OKEN Scanner

teanc, de structuri plane ale aminoacililor din alcătuirea siturilor și structuri plane asemănătoare ale liganzilor. De exemplu, inelele aromatice ale fenilalaninei, tirozinei, gruparea indol a triptofanului, cea imidazolică a histidinei sînt structuri plane care, interpunîndu-se cu structurile plane ale bazelor purinice și pirimidinice ale NAD, ale nucleotidelor libere, ale resturilor nucleotidice din acizii nucleici, constituie forțe de intercalare (fig. 61 și 3). Schimbări conformaționale de tip alosteric sînt incriminate și în interacțiunile proteine-acizi nucleici. În acest caz, liganzii sînt macromolecule care depășesc adesea mărimea proteinelor alosterice în unele situații cu mai multe ordine de magnitudine (de 10^2, 10^3 sau 10^4 ori). S-a subliniat, de exemplu (în cap. III), că ADN poate ajunge la greutăți moleculare de ordinul a 10^{10} daltoni și mai mult. În acest caz, interacțiunea biunivocă moleculă de ligand (ac nucleic)-proteină se exercită între două segmente limitate din cele două macromolecule, situl cognitiv din structura ligandului și situl cognitiv din structura proteinei.

4. *Situl cognitiv de ligand macromolecular.* La acizii nucleici acesta este de importanță deosebită pentru interacțiunile specifice din controlul cantitativ al expresiei genice. Specificitatea sitului trebuie să fie de un grad foarte înalt, deoarece interacțiunea cu situl cognitiv proteinic se impune a fi de mare fidelitate pentru a se realiza discriminarea interregională. De exemplu, represorul lac din sistemul clasic operon trebuie să recunoască segmentul operator lac format din 25—30 de perechi nucleotidice reprezentînd o regiune minimă dintr-o moleculă de ADN formată din 3×10^6 perechi nucleotidice. Deoarece scheletul glucidofosforic exterior este de o omogenitate incompatibilă cu selectări regionale și cu existența de situri cognitive discriminatorii, numai secvența bazelor interiorizate are capacitatea să confere diversitatea necesară diferențelor segmentare. Dar poziția ascunsă a bazelor, în interiorul moleculei defavorizează energetic și structural interac-

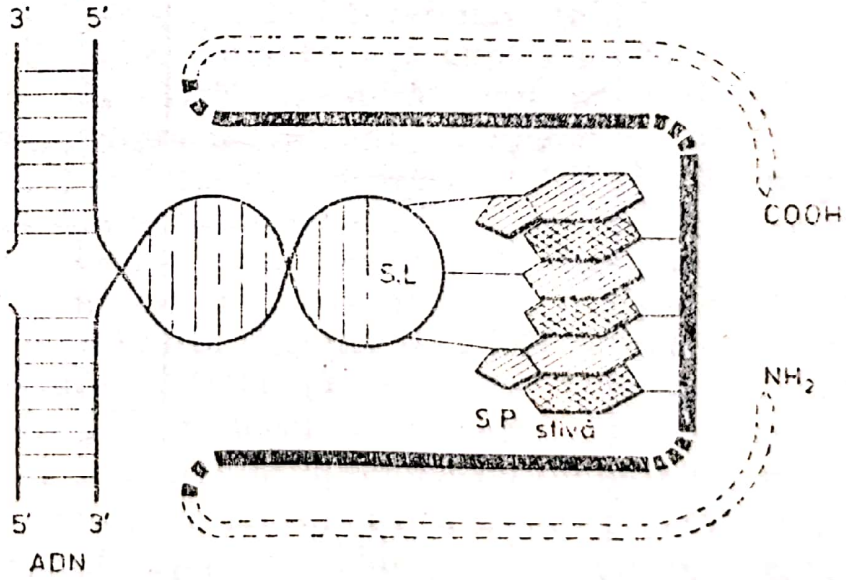


Fig. 61. Ilustrare pur grafică a legăturilor de stivuire instalate prin intercalarea bazelor unui sit de ligand proeminent (de acid nucleic) cu structurile plane ale inelelor aromatice din resturile tirozil și fenilalanil ale unui sit cavitar proteinic(SP). Porțiunile întrerupte ale lanțului polipeptidic simbolizează restul de inflexiuni sterice ale structurii tridimensionale.

ţiunea cu proteinele alosterice globulare. Pînă nu demult se considera ipotetic posibilitatea ca interacţiunea cu bazele să fie realizată la nivelul adînciturilor (engl. *groove*) dintre lanţurile glucidofosforice exterioare (cap. III) care ar permite un oarecare acces al interacţiunii baze-proteine. S-a presupus, mai ales pentru adînciturile mari, funcţia de sit de interacţiune cu proteinele. Dar adîncitura mare are o profunzime sub 20 Å şi o lărgime sub 30 Å, dimensiuni care sînt cu mult sub nivelul curburii de suprafaţă a unei proteine globulare. Mai mult, toate observaţiile asupra structurii tridimensionale a proteinelor atestă că siturile proteinice de interacţiune sînt cavitare. Astfel, ipoteza cavitară pentru siturile cognitive din ADN destinate interacţiunii cu proteinele se află în dezacord cu configuraţia sterică, opusă fiind principiului general al suprafeţelor complementare pentru interacţiunea macromoleculă — macromoleculă (cap. II). Pentru structurile naturale ale ADN sînt precizate siturile de extremitate (să le numim exosituri) specifice polimerazelor şi exonucleazelor, iar siturile de excizie sau de crestare, deşi interiorizate, mimează exositurile (cap. XI, XIII). Proteinele alosterice care interacţionează cu ADN (de exemplu, represorii) recunosc situri cognitive nesituate la extremitatea unei molecule de ADN, ci în interior, adică sînt endosituri şi nu exosituri. Pentru ADN, endositurile cognitive sînt descrise spaţial în forma modelelor ipotetice. Gierer (1966), inspirîndu-se din cunoştinţele acumulate asupra structurii ARNt, a propus un model în care segmentul operator din ADN, endosit cognitiv pentru represor, dobîndeşte o structură cruciformă printr-un proces de desfăşurare-reînfăşurare. În

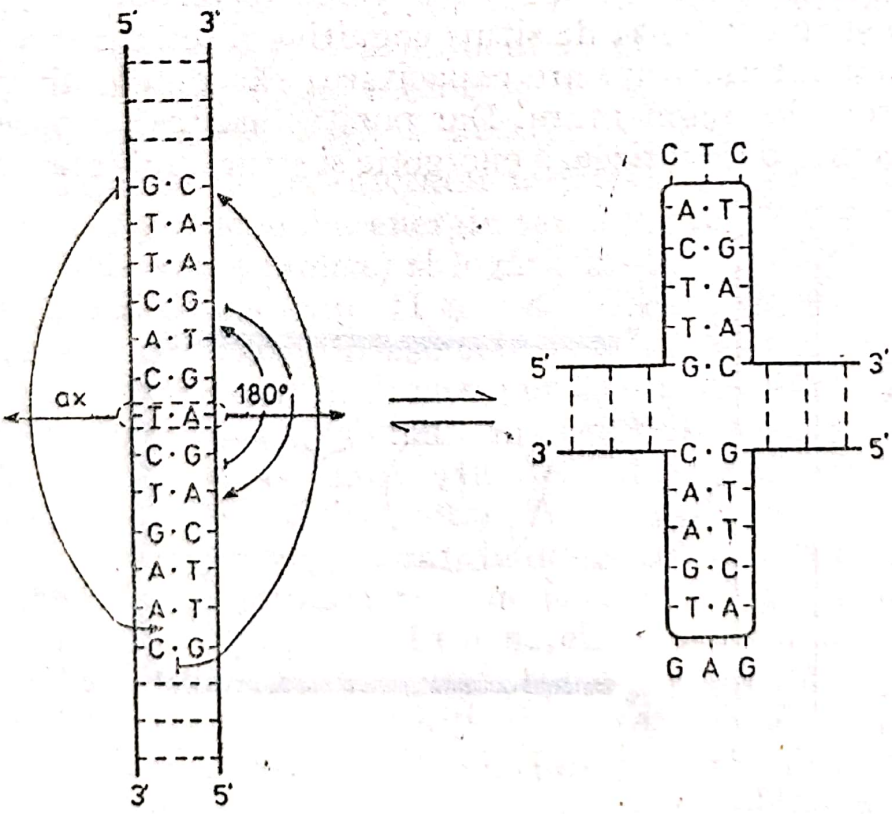


Fig. 62. Schematizarea modelului original al lui Gierer (1966) propus pentru a explica formarea sitului pentru represor din modelul operon. Se redă bisimetria rotatorie palindromică. În prezent acest model este progresiv generalizat pentru explicarea siturilor ADN de interacţiune cu diverse enzime ADN-specifice.

Scanned with OKEN Scanner

această ipoteză s-a presupus că secvenţele nucleotidice din segment prezintă o bisimetrie rotatorie (engl. *twofold rotatory simmetry*) (fig. 62), în sensul că faţă de mijlocul segmentului jumătatea stîngă a catenei 5′—3′ este complementară jumătăţii drepte a aceleiaşi catene, iar jumătatea stîngă a catenei 3′—5′ este complementară jumătăţii drepte a celei din urmă catene. Catena are simetrie rotatorie, deoarece rotirea imaginară a segmentului cu 180° prezintă aceeaşi bisimetrie catenară de complementaritate a bazelor. Desfăşurarea locală a segmentului cu bisimetrie rotatorie sub acţiunea unor factori specifici (cum ar fi un agregat endonuclează-enzimă de desfăşurare-ligază) ar permite stabilirea de legături de hidrogen între jumătăţile complementare de pe aceeaşi catenă şi formarea de bucle monocatenare stabilizate de braţe bicatenare în poziţie transversă faţă de axul general al moleculei (fig. 62). Situl cognitiv ar avea o structură în ac de păr şi ar fi proeminent sau convex, potrivit complementar sitului proteinic obişnuit cavitar. Segmentele cu bisimetrie rotatorie sînt numite palindroame şi sînt frecvent întîlnite în ADN repetitiv la eucariote (cap. III şi IV). Această ipoteză a fost preluată de Crick (1971) pentru a sublinia necesitatea ca endositurile cognitive să aibă o configuraţie convexă, proeminentă, complementară steric siturilor cavitare ale proteinelor interactive. Ipoteza structurilor în „ac de păr" concordă cu structuri similare demonstrate la ARN viral de la bacteriofagii ARN. Structura reversibilă în ac de păr (sau cruciformă) implică însă tensiuni intramoleculare mari posibil de a fi contracarate energetic de proteine stabilizatoare. Studii fizico-chimice numeroase demonstrează că ADN bicatenar în soluţie dobîndeşte conformaţii diferite în funcţie de concentraţii ionice variate, de hidratare, de temperatură. S-a demonstrat, de exemplu, că segmente semnificativ de mari din ADN desperechează tranzitoriu, iar aceste desperecheri cuprind pînă la 1% din totalul de perechi nucleotidice. Se sugerează astfel posibilitatea ca *in situ* ADN bicatenar să aibă ritmic o trecere segmentară reversibilă: ADN bicatenar înfăşurat ⇌ ADN bicatenar desfăşurat. Cu alte cuvinte, aşa cum sugerează Hotchkiss (1974), moleculele de ADN „respiră" sau prezintă mişcări pulsatorii ritmice de desfăşurare incompletă, reînfăşurare. Mai mult, siturile de acţiune ale endonucleazelor restrictive au bisimetrie rotatorie (cap. XIV) ca şi cea propusă de Gierer, iar determinarea secvenţei nucleotidice a operatorului lac a demonstrat segmente de 3—6 perechi nucleotidice cu bisimetrie rotatorie (Gilbert şi Maxam, 1973). Aceste date sugerează că endositul cognitiv de ADN ca ligand macromolecular are o structură spaţială proeminentă convexă în care catenele de ADN sînt desfăşurate local iar secvenţa de baze dispusă în palindrom poate avea interacţiuni specifice cu aminoacilii sitului cavitar din proteina alosterică. Se presupune că natura interacţiunilor este aceeaşi, adică legături dipol (de hidrogen şi ionice), legături

Scanned with OKEN Scanner

apolare, legături de stivuire (fig. 3 și 61) și eventual punți metalice coordinative. Secvența nucleotidică din endositul cognitiv și secvența aminoacidică din situl proteinic asigură specificitate sterică distribuției de ansamblu a interacțiunilor de slabă energie, în așa fel încît cele două situri se recunosc cu un grad mare de fidelitate.

5. *Natura schimbărilor conformaționale induse de liganzii-efectori alosterici și consecințele asupra activității și proprietăților fizico-chimice ale proteinelor alosterice.* Interacțiunea ligand-sit cognitiv în stadiul de recunoaștere provoacă schimbări în starea de torsionare a segmentului polipeptidic care alcătuiește situl. Această modificare se transmite ca o undă în masa globulară flexibilă a proteinei și provoacă desfacerea unor legături de slabă energie, stabilirea altora, schimbări în gradul de inflexiune al celorlalte segmente, schimbări ale forțelor de legare intersubunitare și în final modificarea conformațională a ansamblului de situri, cu consecințe imediate asupra capacității lor funcționale. Interpretarea schimbărilor conformaționale alosterice nu a fost concepută unitar. Două concepții au fost mai mult dezbătute și discutate: a) concepția schimbărilor conformaționale concertate, simultane în toate subunitățile cu interconversie pe calea unei izomerizări în echilibru (Monod și colab., 1965); b) concepția modificărilor conformaționale cu independență subunitară și cu posibilitatea existenței de hibrizi conformaționali intermediari (Koshland și colab., 1966; Kirtley și colab., 1967) (fig. 63). Deoarece shimbările conformaționale ale tranzițiilor alosterice se desfășoară cu o viteză mare, în unități de timp de ordinul microsecundelor, a fost dificil la început să se rezolve această diferență de concepție. Pentru a urmări schimbările de mare viteză ale proteinelor alosterice, s-a aplicat principiul metodei de relaxare formulate de Eigen și De Mayer (1963). Acest principiu se bazează pe constatarea că un sistem reacțional (de exemplu, o enzimă și substratul său) este într-un echilibru la parametri constanți de presiune, temperatură, concentrație, pH. Dacă unul

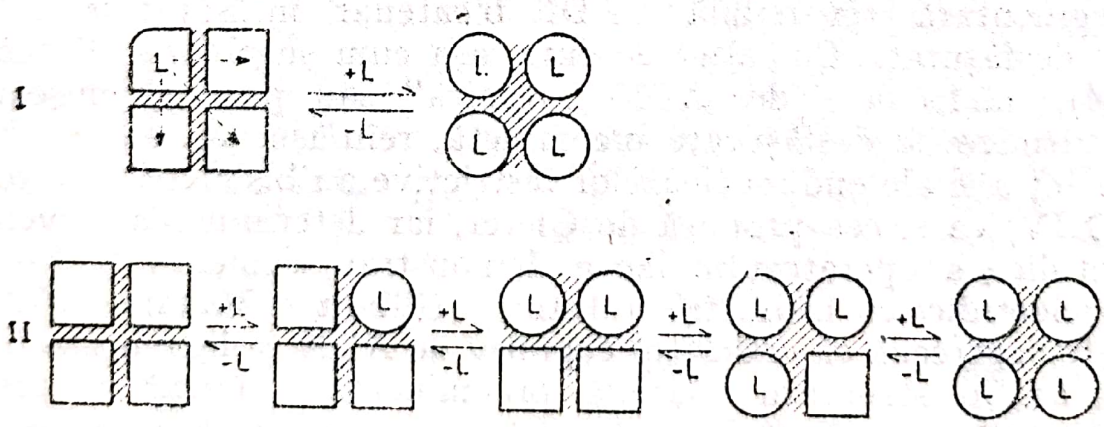


Fig. 63. **Dinamica schimbărilor conformaționale ale subunităților din structura unei proteine alosterice** (după Monod, 1967). I. — Modelul tranziției conformaționale concertate cu răspuns unitar de tip „totul sau nimic". II. — Modelul modificărilor în etape cu schimbări subunitare independente. L = ligand.

Scanned with OKEN Scanner

dintre acești parametri externi sistemului se schimbă, atunci sistemul nu mai este în echilibru și se va comuta într-o altă poziție de echilibru impusă de schimbarea parametrului (Malcolm, 1975). Schimbarea în poziția de echilibru este o interacțiune chimică de slabă amplitudine și necesită un timp de producere foarte scurt, de ordinul microsecundelor, numit timp de relaxare. Observarea fracțională a acestui timp de relaxare nu poate fi efectuată cu metode în care parametrii externi sînt modificați lent, în valori de timp care depășesc de sute de ori timpul de relaxare. De aceea s-a utilizat tehnica saltului termic (engl. *temperature jump technique*) capabilă să provoace creșterea temperaturii unui volum mic de soluție a reactanților, cu 5—10 °C în timp de 5—10 μs, prin descărcarea unui condensator într-un circuit în care se află și soluția observată. Aceste tehnici aplicate de Kirschner și Schuster (1970) la interacțiunea dintre NAD și D-gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenază (coenzimă-apoenzimă) au furnizat date care susțin mecanismul concertat de tip „tot sau nimic" în schimbările conformaționale. Prin metoda saltului termic aplicată și la cinetica altor enzime s-au adus confirmări repetate pentru modelul lui Monod și colab. (1965).

Cooperativitatea intersubunitară determină ca cinetica de interacțiune, dedusă din saturarea cu liganzi, să dobîndească un profil sigmoidal în raport cu timpul de desfășurare (fig. 64). Acest profil este furnizat de modul de interacțiune ligand-proteină: prima interacțiune ligand-proteină declanșează o viteză mult mai mare de interacțiune la nive-

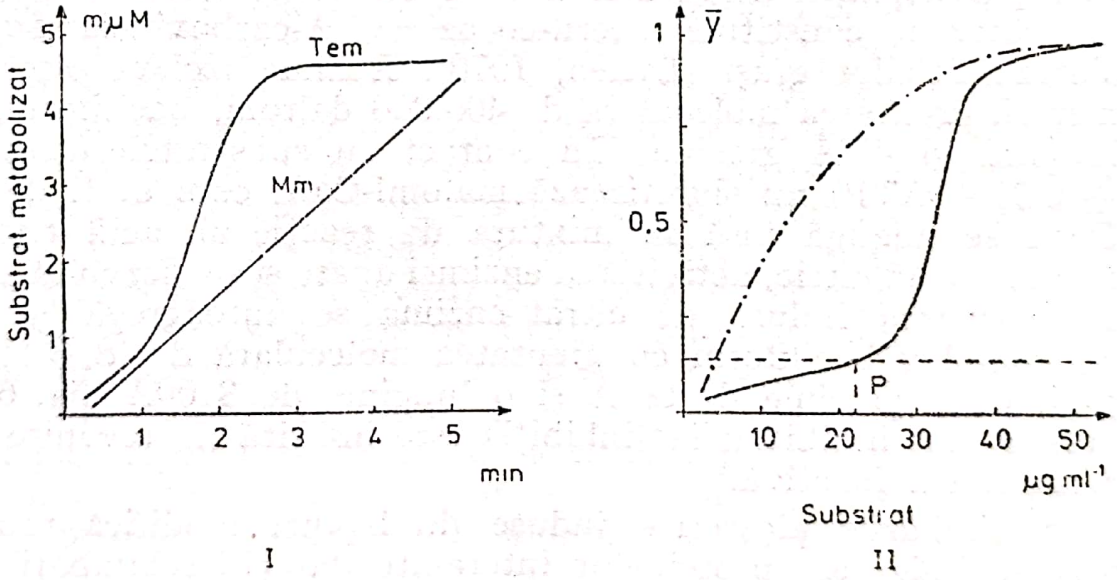


Fig. 64. **Răspunsul sigmoidal al proteinelor alosterice și importanța funcțională a tranzițiilor concertate din alosterism.** I. — Viteza de metabolizare a substratului atinge valori maximale mai rapid la proteinele alosterice (Tem)oligomere decît la proteinele monomerice (Mm). II. — Variațiile mici supraliminare de concentrație a substratului conduc la creșteri ample, sigmoidale, ale enzimei specifice. Denumirea de sigmoidal provine de la Σ, simbol al sumei iar diagrama sigmoidală este un rezultat al însumării concertate de interacțiuni subunitare.

Scanned with OKEN Scanner

lul celorlalte situri cooperante în macromolecula oligomeră şi permite un răspuns însumat, mai rapid. De exemplu, dacă se compară modul de oxigenare al hemoglobinei tetramere de la mamifere cu cel al hemoglobinei monomere de la unii viermi, se constată că încărcarea cu oxigen a celei dintîi prezintă accelerarea sigmoidală după o primă fază de creştere lentă ajungînd într-un timp de cîteva ori mai scurt la saturaţia maximă. Cea de-a doua se oxigenează pentru fiecare monomer cu aceeaşi viteză, ca în prima fază de încărcare a tetramerului, după o diagramă liniară iar nivelul maxim de saturaţie este atins într-un timp de cîteva ori mai mare. Aşa cum sublinia Monod (1967), structura multisubunitară a enzimelor permite cooperativitatea intermoleculară şi prezintă un avantaj selectiv, deoarece răspunsul este mai rapid (fig. 64). Avantajul cineticii sigmoidale rezultă şi din felul în care se schimbă viteza de reacţie a proteinei alosterice în funcţie de concentraţia liganzilor. Pentru fiecare ligand există o concentraţie liminară sub care orice schimbare nu produce variaţii semnificative în viteza de reacţie. Schimbări cantitative mici în concentraţia ligandului peste cea liminară conduc la variaţii ample ale vitezei de reacţie. Aceasta asigură o mare sensibilitate a enzimei la variaţii cantitative supraliminare şi un răspuns mai rapid care se opune cu promptitudine acumulărilor nefiziologice de ligand (substrat, metabolit final al unei căi de sinteză) (fig. 64).

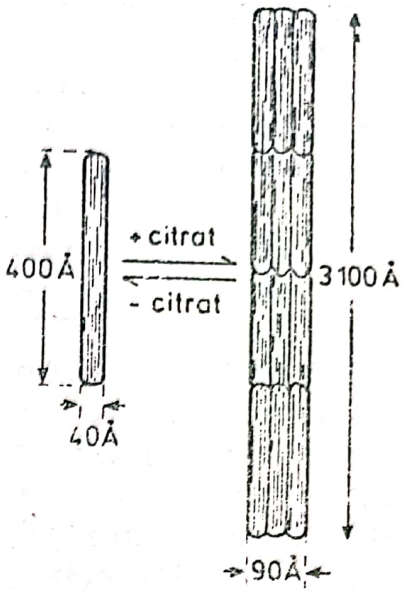
Sînt sisteme alosterice în care creşterea sau scăderea activităţii specifice are loc prin mărirea şi respectiv scăderea numărului de subunităţi participante în formarea unei structuri unitare. Un exemplu ilustrativ îl constituie acetil-coenzima A-carboxilaza angajată în sinteza acizilor graşi (Lynen, 1970). Enzima izolată este un tetramer cu greutatea moleculară de 400 000 daltoni, baciliform, de 400Å lungime şi 40 Å grosime. În contact cu substratele (acetil-Co'A + + CO_2 + ATP) nu sintetizează malonil-CoA, cum ar fi de aşteptat. Dacă se adaugă însă în mixtura de reacţie un acid tricarboxilic, mai ales acid citric, activitatea enzimei apare şi se dezvoltă sigmoidal. În activarea indusă de citrat enzima se autoagregă şi formează un complex baciliform cu greutatea moleculară de $8,8 \times 10^6$ daltoni, cu o grosime de 90 Å şi o lungime de 3100Å (fig. 65). Acizii graşi îi sînt inhibitori iar inhibiţia este însoţită de revenire la forma tetramerică inactivă.

Schimbările alosterice induse de liganzi modifică proprietăţile fizico-chimice ale proteinelor interesate datorită schimbărilor conformaţionale şi nu unor modificări în structura chimică brută. Proprietăţile fizico-chimice mai frecvent modificate sînt: rezistenţa termică, migrarea electroforetică, viteza de sedimentare ultracentrifugală, schimbarea rezistenţei faţă de proteaze, schimbarea spectrului de absorbţie în ultraviolete, morfostructuri electronooptice diferite.

Schimbările alosterice care duc la modificarea masei moleculare

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 65. Schimbările de agregare subunitară concomitente tranziţiilor alosterice ale acetil—CoA carboxilazei (după Lynen, 1970). Explicaţii în text.



prin agregări subunitare în molecule mari au ca efect apariţia de noi parametri fizico-chimici semnificativ diferiţi de la o stare la alta. Oricum, amplificarea stării de agregare este însoţită şi de o mărire a cooperativităţii care conduce numai la creşterea activităţii funcţionale şi nu la scăderea acesteia.

6. *Cooperativitatea intermoleculară şi alosterism la nivel supramolecular; implicaţiile funcţionale ale mecanismului alosteric.* La agregatele moleculare eterogene cu implicaţii profunde în expresia genică, aşa cum sînt ribozomii şi cromozomii, schimbările conformaţionale sînt de mare importanţă pentru îndeplinirea funcţiilor lor. La nivelul cromozomilor, descrierea de proteine contractile fibrilare de tipul actinei şi miozinei (Holzer şi Rubinstein, 1977, Bonner, 1977) sugerează participarea acestora în procesele de condensare şi decondensare şi permit o explicaţie moleculară pentru marile schimbări conformaţionale ale cromozomilor. La ribozomi nici una din proteinele descrise nu s-a dovedit a avea proprietăţi contractile şi totuşi ribozomul prezintă schimbări conformaţionale în interacţiunile cu liganzi macromoleculari (ARNm, ARNt, factori de iniţiere, de elongaţie şi de terminare). Mai mult, s-au descris factori care au rolul de a întări şi favoriza interacţiuni care s-ar produce şi în absenţa lor, dar mai lent (cap. VII). Astfel se poate considera că ribozomii şi factorii proteinici participanţi în etapele de sinteză a polipeptidelor funcţionează pe baza unor relaţii de alosterism supramolecular. Într-un astfel de alosterism, fiecare factor singular nu manifestă alosterism, dar încorporat în ansamblul ribozomal de sinteză a proteinelor devine cooperant (sau concertat). Astfel, chiar proteinele monomere pot fi efemer, numai în timpul exercitării funcţiei, părţi constitutive ale unui ansamblu alosteric.

Reissig, în 1974, subliniind nivelul ridicat de organizare a membranei celulare de suprafaţă, o consideră pe aceasta capabilă să se

manifeste în multe privinţe ca o macromoleculă de ordin superior. Fluiditatea relativă a membranei atestă nivelul energetic scăzut al legăturilor intermoleculare şi capacitatea de a avea rearanjamente după necesitatea funcţiilor impuse de interacţiuni cu liganzi. Autorul presupune că schimbarea conformaţională a unei proteine de membrană poate declanşa o tranziţie în starea întregii membrane (de exemplu, schimbarea cantitativă a sarcinilor electrice expuse şi în consecinţă modificarea echilibrului electrostatic de suprafaţă). Reissig propune ca astfel de schimbări să fie desemnate ca alosterisme supramoleculare ale membranei şi învelişului celular.

În prezent, conceptul alosteric — legat în particular de numele lui Monod — a dobîndit universalitate şi este implicat ca mecanism bazal în interacţiuni de control cantitativ la nivelul molecular, la treapta structurilor supraadăugate de organit subcelular, cît şi la nivelul interacţiunilor celulă-celulă din ansamblul tisular. Mecanismul alosteric stă la baza modulării reacţiilor din întregul metabolism prin autoaccelerarea sigmoidală a activităţii proteinelor şi prin inhibiţia sau stimularea căilor metabolice în circuite *feed-back*. Mecanismul alosteric explică interacţiunile polimerazelor în agregatele complexe, fie de replicare, fie de transcriere, este fundamentul în inducţia şi represia sintezei de enzime, poate fi implicat în activarea şi inactivarea genică, explică modul de funcţionare a complexelor polizomale în sinteza de proteine, este mecanismul sugerat pentru acţiunea hormonilor la nivel celular şi poate fi implicat în interacţiunile moleculare ale transmisiei influxului nervos. Mecanismul alosteric se află la baza proceselor de modulare şi de derepresie-represie ale expresiei genice. Modificările conformaţionale concertate ale agregatelor moleculare structural definite (ribozomi, membrană celulară) extind mecanismul alosteric la un nivel superior de organizare structural-funcţională, denumit alosteris supramolecular. La acest nivel chiar proteinele monomere sînt tranzitoriu integrate într-un ansamblu în care în mod efemer ar dobîndi proprietăţi alosterice.

3. **Modularea cantitativă prin controlul enzimelor reglatoare.** Enzimele reglatoare sînt proteine alosterice a căror activitate este controlată de liganzi specifici şi condiţionează, prin poziţia reacţiilor biochimice pe care le catalizează, nivelul de activitate manifestat fie de o cale metabolică luată separat, fie de mai multe căi metabolice interconectate prin metaboliţi intermediari comuni şi reacţii de intersecţie. Enzimele reglatoare nu constituie o grupă aparte din clasificarea internaţională şi fiecare enzimă cu proprietăţi reglatoare aparţine, potrivit funcţiei, la una din grupele principale: oxidoreductaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze sau ligaze. Proprietăţile generale ale enzimelor reglatoare sînt descrise în continuare. 1) Acţionează fie la începutul unei căi metabolice, fie la punctul de ramificaţie a două căi metabolice cu etape aprioric comune (fig. 67), fie la nivelul

Scanned with OKEN Scanner

intersectării a două sau mai multe căi metabolice (Stadtman, 1966; Lynen, 1970) (fig. 68) ; 2) Prezintă efecte alosterice homo- și eterotrope pozitive și/sau negative prin interacțiunea cu metaboliți deosebiți steric de substrat ; 3) Sînt proteine oligo- sau multimerice formate fie din lanțuri polipeptidice diferite, fie din polipeptide identice ; 4) Au mai multe situri de legare pentru fiecare ligand în parte iar interacțiunea cu fiecare ligand are o cinetică sigmoidală (fig. 64) cu avantaje importante reglatoare ; 5) Unele enzime reglatoare au subunități reglatoare și catalitice separate. Primele interacționează numai cu ligandul alosteric iar celelalte numai cu substratul (fig. 60) ; 6) Sînt mai sensibile la degradarea continuă proteinică sub acțiunea proteazelor de *p*H neutru și în consecință au o metabolizare mai rapidă (Goldberg și Dice, 1974). Metabolizarea moleculelor de enzimă prin degradare este influențată de liganzi. Schimbările conformaționale concomitente legării liganzilor scad procesele degradative, absența și scăderea concentrației de liganzi cresc procesele degradative ; 7) Capacitatea lor reglatoare se caracterizează prin răspunsuri rapide în modularea nivelului de sinteze și catabolizări din metabolismul intermediar ; 8) Proprietățile reglatorii sînt dependente de structura primară și implicit sînt expresii genice codificate în transferul informațional.

1. *Enzimele reglatoare în mecanismul feed-back de modulare a expresiei genice la nivelul activității proteinelor.* În general, prin *feed-back* se înțelege un sistem de control al unei activități în care o deviație cantitativă de o amplitudine oarecare provoacă acțiunea factorilor de control caracteristici sistemului ca modificatori ai deviației (Warburton, 1955). Dacă acești factori se opun deviației acțiunea se numește *feed-back* negativ, dacă o potențează amplificînd-o, are loc un *feed-back* pozitiv. Factorii de control din sistemul *feed-back* sînt în general produșii finali ai unei activități și acțiunea lor este retroactivă asupra fazelor precursoare propriei lor produceri (fig. 66). Ca urmare, termenul de *feed-back* a fost înlocuit adesea cu termenii „acțiune retroactivă", „conexiune inversă", „retroacțiune", „retroinhibiție". Conceptul *feed-back* din teoriile de sistem și-a găsit o largă aplicativitate în explicarea mecanismelor de control cantitativ al diferitelor funcții exercitate în activitatea neurohormonală.

În expresia genică s-a observat că mecanismul *feed-back* este implicat în modularea cantitativă a activității enzimelor. Termenul de *feed-back* este, în mod obișnuit, limitat la mecanismele de control al activității proteinelor și în particular la enzimele metabolismului intermediar. S-au descris mecanisme *feed-back* în controlul sintezei de aminoacizi și al sintezei de ribonucleotide și dezoxiribonucleotide, în reglarea sintezei acizilor grași, în gliconeogeneză, dar și în căile de degradare a metaboliților intermediari în procesele catabolice de glicoliză, de ardere a lipidelor, aminoacizilor și nucleotidelor.

Scanned with OKEN Scanner

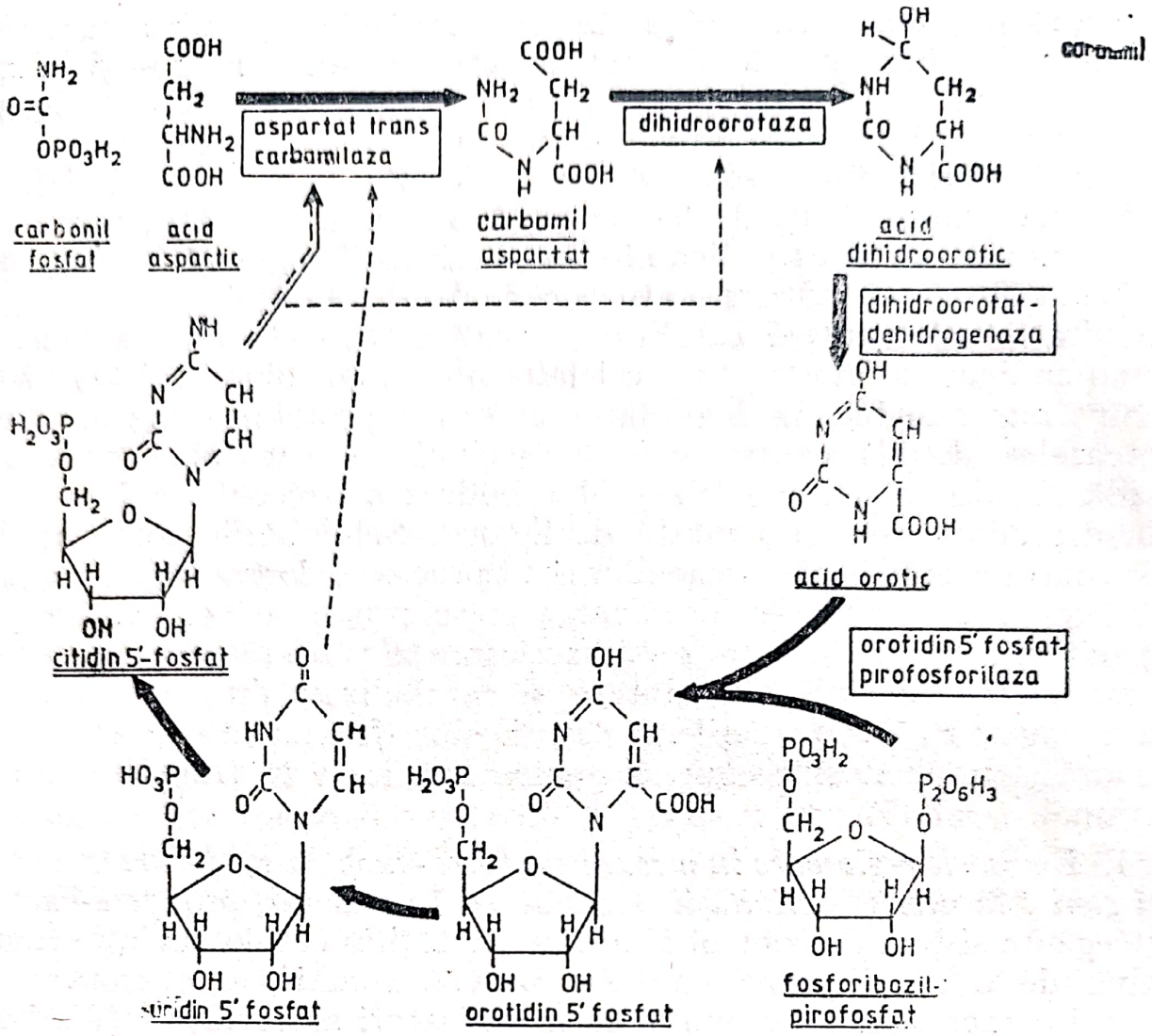


Fig. 66. **Sistemul de inhibiție feed-back în calea de sinteză a nucleotidelor pirimidinice pentru ilustrarea modulării unei căi metabolice simple.** Aspartat transcarbamilaza = = enzima reglatoare. Citidin-5′ fosfat și uridin-5′-fosfat = liganzi alosterici. Carbamil fosfat și acid aspartic = substraturi. Din formulele chimice rezultă alosteria lor, trăsătură care a dus la geneza termenului atît de utilizat în prezent. În sistemul redat, cel mai potent inhibitor este citidin 5′ trifosfatul (CTP).

Mecanismul de control *feed-back* poate fi definit ca un sistem de modulare cantitativă a unei căi metabolice în care acumularea produsului final acționează retroactiv și scade nivelul de activitate al întregii căi, iar deficitul cantitativ de produs final duce la o creștere a aceleiași activități. Așa cum se ilustrează în fig. 66, mecanismul *feed-back* se manifestă într-un sistem constituit dintr-o cale metabolică, o enzimă reglatoare specifică și efectorii de *feed-back* reprezentați de produșii finali (fig. 66, 67). Creșterea concentrației de produs final duce la legarea acestuia la nivelul enzimei reglatoare căreia îi induce, prin tranziții alosterice, scăderea activității, iar aceasta se reflectă asupra întregii căi. Scăderea activității unei căi metabolice prin creșterea concentrației de produs final se numește inhibiție *feed-back*. Consumul produsului final — fie prin utilizare în alte sinteze anabolice, fie prin

Scanned with OKEN Scanner

degradare catabolică — scade concentrația produsului final pînă la valori care provoacă anularea interacțiunii cu enzima reglatoare. Cea din urmă, eliberată de ligand, redobîndește conformația activă inițială printr-o tranziție alosterică inversă, întreaga cale metabolică se activează și începe să producă metabolitul final. Modularea *in vivo* a activității diferitelor căi metabolice este mai complexă, deoarece nici o cale metabolică nu se desfășoară izolat. Diferite etape reacționale sînt comune la căi metabolice diverse, iar ramificările celor din urmă duc la ambiguități în desemnarea cu precizie a primei etape metabolice din calea de sinteză a fiecărui metabolit care este considerat produs final (fig. 67). La fel s-a observat că susceptibilitatea la produși finali nu se limitează numai la enzima primei etape, ci uneori și la enzima celei de-a doua (fig. 66). De exemplu, calea metabolică de sinteză a lizinei prezintă ramificații și intersectări cu sinteza

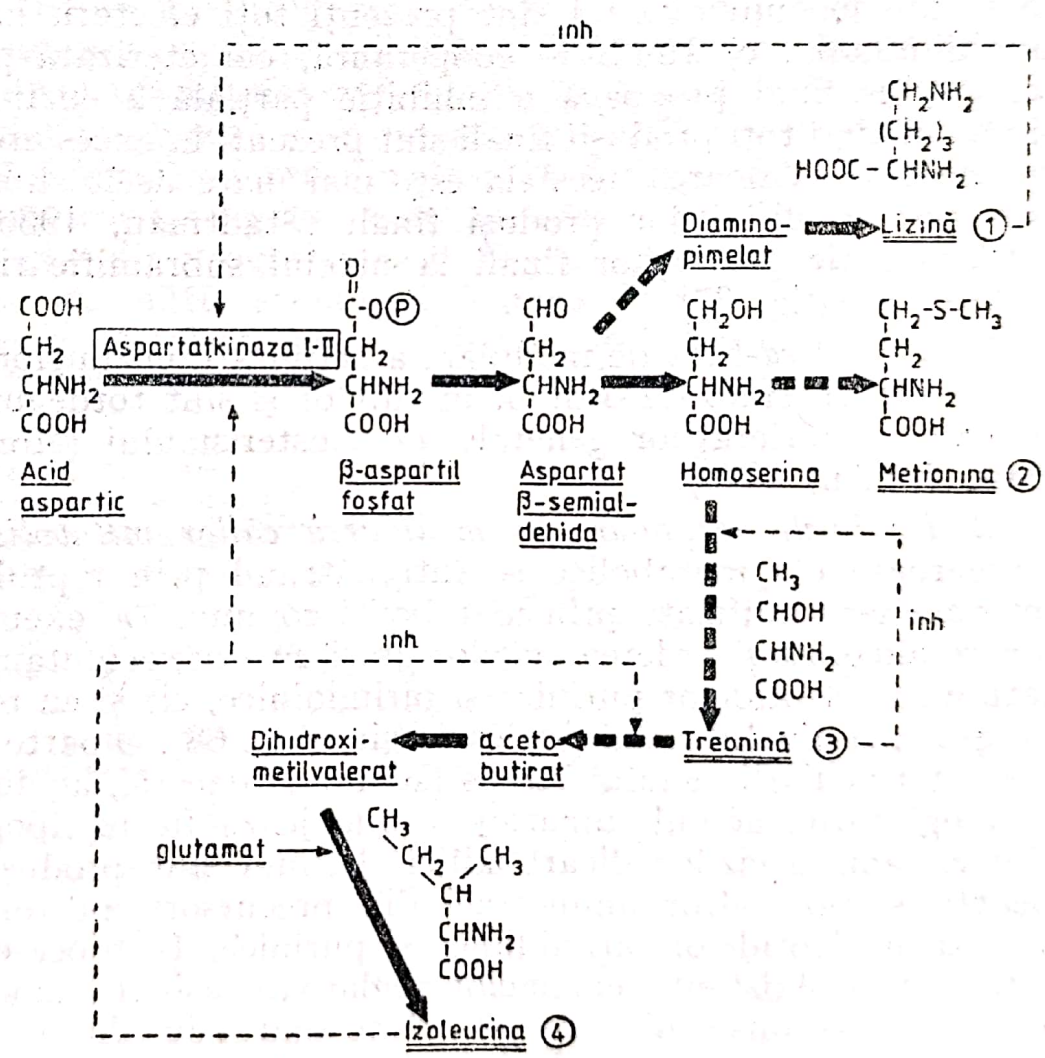


Fig. 67. Cale metabolică ramificată pentru sinteza lizinei, metioninei, treoninei și izoleucinei. Enzima reglatoare-aspartat-kinaza produce metaboliți precursori pentru patru produși finali diferiți (1, 2, 3, 4) (după Monod și colab., 1963, cu modificări). Inh = inhibiție feed-back. Aspartat-kinaza este enzimă reglatoare comună. Modul de rezolvare a modulării diferențiate este descris în text.

Scanned with OKEN Scanner

treoninei, izoleucinei, metioninei, deoarece conversia aspartatului în aspartilfosfat este o reacție precursoare comună (fig. 67). Enzima reglatoare aspartat-kinaza este inhibată de lizină în cadrul unui mecanism *feed-back* și scade sinteza de aspartil-fosfat și implicit activitatea întregii căi de sinteză a lizinei. Efectul modulator lizinic ar trebui să se repercuteze și asupra sintezei de treonină, izoleucină și metionină. Această depășire a specificității nu are loc sau este nesemnificativă, deoarece căile metabolice divergente rezultate prin ramificări au grade semnificative de segregare în modularea cantitativă prin *feed-back*. Elaborarea acestei segregări relative, în ciuda etapelor precursoare comune de sinteză, se realizează în diferite moduri: a) Existența de izozime care catalizează aceeași reacție, dar care au susceptibilități diferite pentru produșii finali; b) Inhibiție concertată (multivalentă), în care toți produșii finali interesați sînt efectori alosterici pentru enzima reglatoare comună, dar acțiunea lor inhibitoare are loc numai cînd sînt prezenți toți efectorii în concentrații supraliminare; c) Inhibiție cooperantă, caracterizată prin aceea că un produs final provoacă o inhibiție parțială a enzimei reglatoare și numai cînd toți produșii finali sînt prezenți în exces are loc o inhibiție maximă. Valoarea acesteia este mai mare decît suma inhibițiilor parțiale ale diferiților produși finali (Stadtman, 1966); d) Efecte alosterice ale produșilor finali la nivelul subramificărilor din calea metabolică (fig. 67).

Efectele *feed-back* de modulare a activității enzimelor se instalează rapid într-un timp de ordinul minutelor și sînt totdeauna reversibile conform proprietăților generale ale alosterismului (Monod și colab., 1963, Lynen, 1970).

2. *Enzimele reglatoare în modularea căilor metabolice intersectate.* Numeroase căi metabolice se întrepătrund prin faptul că au etape intermediare unificate prin metaboliți comuni. De exemplu, cuplarea dintre glicoliză și arderea acizilor grași cu sinteza glutamatului, aspartatului, nucleotidelor purinice și pirimidinice, cît și cu resinteza acizilor grași, la nivelul ciclului tricarboxilic (fig. 68). O parte semnificativă din intermediarii ciclului Krebs (acidul oxalacetic, acidul citric, acidul α-cetoglutaric, acidul fumaric) se angajează fie în lipogeneză, fie în sinteza aminoacizilor dicarboxilici. Ultimii sînt produși de răscruce pentru sinteza altor aminoacizi din precursori α-cetonici, cît și în sinteza nucleotidelor pirimidinice și purinice. În procesele metabolice intersectate existența enzimelor reglatoare asigură modularea cantitativă de răspuns rapid care hotărăște soarta imediată a metaboliților implicați. De exemplu, în lipogeneză citratul produs în ciclul tricarboxilic interacționează cu acetil CoA-carboxilaza, îi induce acesteia o tranziție alosterică pozitivă care duce la forma activă supraagregată (fig. 68) și se declanșează lipogeneza. În același context, consumul de acetil din complexul acetil-CoA stimulează enzima de clivaj a citra-

Scanned with OKEN Scanner

tului dependentă de CoA liberă și reface din nou acetil-CoA și oxal-acetat. Scăderea progresivă a citratului conduce la desprinderea lui din interacțiunea cu carboxilaza acetil-coenzimei A iar aceasta se schimbă conformațional în forma de agregare inactivă. Într-un mod asemănător interacționează și alte enzime reglatoare care vizează sinteza de α-cetoglutarat, glutamat, aspartat și asigură un echilibru între căi metabolice interconectate prin metaboliți comuni, dar funcțional distincte (fig. 68). Expresia genică a modulării cantitative din căile metabolice cu intermediari comuni și cu sens opus este asigurată tot de enzime reglatoare. Un exemplu ilustrativ îl constituie glicoliza și neoglicogeneza. Ambele căi au produși intermediari comuni și în condiții fiziologice sînt unidirecționale cu sensuri opuse. Glicoliza este unidirecțională, deoarece are două reacții puternic exergonice, motiv pentru care sînt fiziologic ireversibile: formarea glucozo-6-fosfat din glucoză și ATP și formarea fructozo-1,6-difosfat din fructoza 6-fosfat și ATP. În neoglicogeneză, aceste două bariere sînt depășite prin înlocuirea lor cu două reacții hidrolitice tot ireversibile: hidroliza esterului fructozo-1,6-difosfat cu formarea fructozo-6-fosfat și hidroliza glucozo-6-fosfat în glucoză și fosfat anorganic. Enzimele catalizatoare ale celor două tipuri de reacții din glicoliză și respectiv neoglicogeneză sînt de tip reglator iar liganzii care activează enzimele glicolizei sînt inhibitori ai celor din neoglicogeneză. De exemplu, fosfofructo-chinaza este activată de AMP stimulînd sinteza fructozo-1,6-difosfat iar fructozo-difosfat-hidrolaza este inhibată de același ligand. Aceste comutări de direcție ale căilor metabolice ambisens oscilează cantitativ

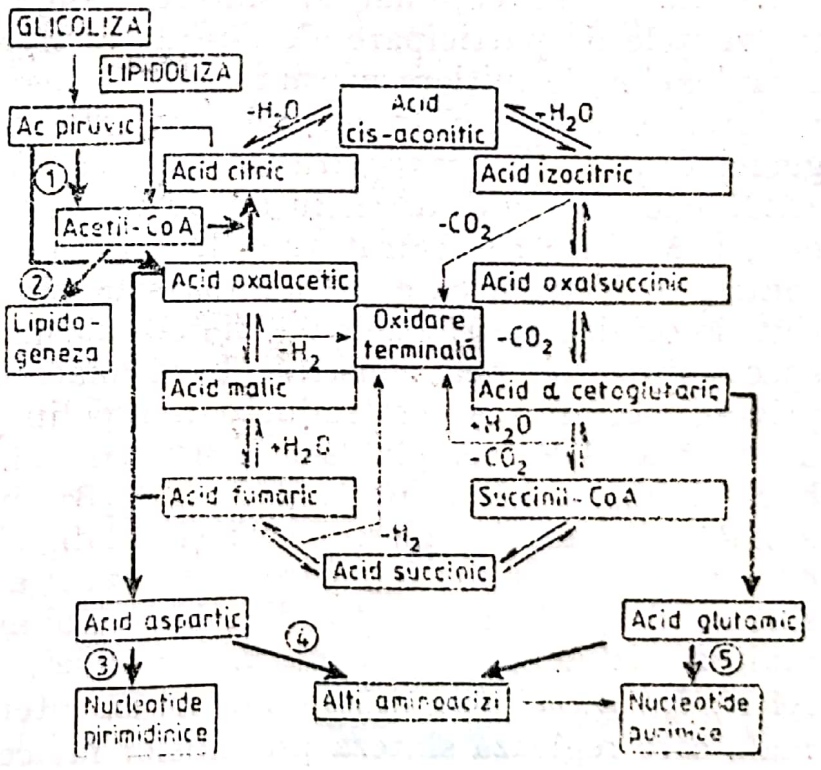


Fig. 68. O parte din intersectările căilor metabolice și anabolice la nivelul ciclului tricarboxilic. Se ilustrează cîteva căi prin care intermediarii oxidării terminale sînt utilizați pentru sinteze anabolice modulate cantitativ de enzime reglatoare: 1. piruvic-carboxilaza care sintetizează acid oxalacetic din acid piruvic și bioxid de carbon; 2. acetil-CoA-carboxilaza, enzimă reglatoare în lipogeneză; 3. aspartat-transcarbamilaza din sistemul *feed-back* al sintezei nucleotidelor pirimidinice; 4. aspartat-kinaza I și II, enzime reglatoare în sinteza lizinei, metioninei, treoninei și izoleucinei; 5. fosforibozil pirofosfat-amido-transferaza, enzimă reglatoare din sinteza nucleotidelor purinice.

Scanned with OKEN Scanner

în raport cu cerințele metabolismului, motiv pentru care enzimele reglatoare interesate au mai fost numite și osciloforе (Hess și colab., 1969). Predominența hepatică a neoglicogenezei față de glicoliză și predominența musculară a glicolizei față de neoglicogeneză este explicată de prezența de izozime diferite în cele două țesuturi, capabile să schimbe echilibrul reacțional al etapelor care le catalizează spre neoglicogeneză și respectiv spre glicoliză.

4. **Controlul cantitativ al expresiei genice prin reglarea sintezei proteinelor la nivelul traducerii.** Expresia genică a metabolismului intermediar este controlată cantitativ și prin reglarea traducerii. Acest mecanism face parte din controlul general de modulare prin care expresia genică se modifică rapid în raport cu cerințele mediului intern sau extern. Nivelul cantitativ al sintezei diferitelor proteine manifestă adesea eterogenitate independentă de cantitățile mesagerilor corespunzători, ribozomilor și tipurilor de ARNt. Această eterogenitate cantitativă a impus convingerea că traducerea diferitelor tipuri de ARNm implică mecanisme de control care vizează diversele etape din sinteza polipeptidelor, fie inițierea, fie elongația, fie terminarea (Allison, 1972). Majoritatea datelor experimentale sugerează însă că inițierea sintezei polipeptidelor constituie etapa în care se desfășoară controlul cantitativ (Lodish, 1974; Bielka, 1977; Revel și colab., 1977). Acest control constă în modificarea selectivă a ratei de atașare a ARNm corespunzător polipeptidului de sintetizat, în complexul inițiator. Scăderea, anularea sau stimularea atașării ARNm au drept consecințe scăderea, blocarea respectiv creșterea întregului proces secvențial unidirecțional al sintezei polipeptidice. S-a observat că frecvențele de participare ale diferitelor tipuri de ARNm la formarea complexelor de inițiere nu sînt egale chiar în condițiile echivalențelor molare. De exemplu, frecvențele de participare a zece ARNm monogenici diferiți de la reovirusuri variază de 10 ori, iar trei gene de ARN bacteriofagic diferă între ele în participarea la inițiere, de 20 de ori. Modificările cantitative din inițiere sînt datorite factorilor de control ai inițierii care pot inhiba sau stimula acest proces. Factorii sînt de origine fie ribozomală, fie citoplasmatică, sînt uneori de mare specificitate și pot constitui baza materială a altor funcții care privesc activitatea posttraductoare a polipeptidelor vizate în circuitul de control. De exemplu, s-a demonstrat că proteinele de înveliș ale bacteriofagilor ARN (MS2, R17, f2, QB) inhibă sinteza de traducere a ARN-sintetazei fagice. Revel și colab. (1977) au izolat un factor de inițiere denumit I_{HB} care are capacitatea de a stimula specific sinteza de lanțuri polipeptidice hemoglobinice. La mamifere sinteza multor enzime este influențată hormonal, independent de sinteza de ARN. La *E.coli* s-au descris factori de interferență de origine ribozomală care reglează sinteza proteinelor fagice în infecția cu fagi ARN.

Scanned with OKEN Scanner

De exemplu, proteina S1 de origine ribozomală inhibă sinteza proteinelor de înveliş şi stimulează producerea de ARN-sintetază. Factorii implicaţi în reglarea procesului de iniţiere modifică viteza de ataşare a ARNm şi acţionează complex fie asupra factorilor IF (în particular IF3 sau IF-E3), fie asupra siturilor ribozomale de ataşare a Met-ARNt$_f$ iniţiator, fie asupra telosegmentului 5′ participant în alcătuirea sitului de ataşare din ARNm.

Modificarea cantitativă a sintezei de proteine la nivelul traducerii este un mecanism de control universal răspîndit, deoarece a fost demonstrat de la bacterii şi virusuri pînă la organismele superioare. Aparent, acest mecanism de control ar fi de prisos faţă de cel care interesează concomitent şi sinteza ARN, deoarece ar conduce la acumularea de ARN ca un balast neeconomicos şi la pierderi materiale şi energetice considerabile. Şi totuşi existenţa mecanismului are o justificare funcţională prin aceea că răspunsul cantitativ la diverşi stimuli este mai rapid cînd vizează direct sinteza proteinelor. Mai ales în cazul moleculelor de ARNm stabil, un sistem de control al sintezei de proteine prin reglarea transcrierii nu ar avea nici un efect, deoarece cantitatea de ARNm stabil gata sintetizată în momentul inhibiţiei transcrierii ar asigura sinteza de proteină specifică timp îndelungat. Totodată, acumularea de ARNm capabil de traducere constituie o rezervă în stare să asigure un răspuns prompt în sinteza de proteine specifice, la acţiunea stimulatorului potrivit. Astfel de acumulări de ARNm s-au descris în fazele embrionare de dezvoltare ale ariciului-de-mare şi la amfibieni (Markert şi Uhrsprung, 1971).

Au fost observate diferenţe cantitative semnificative şi în traducerea de segmente diferite ale ARN macromesageri multigenici. De exemplu, ARNm macromesager codificator al enzimelor pentru sinteza histidinei la *Salmonella typhi murium* sintetizează de şase ori mai multă fosforibozil-adenozintrifosfat-sintetază decît celelalte 6 enzime codificate de acelaşi ARNm. În mod similar, ARNm corespunzător operonului Lac codifică de trei ori mai multă β-galactozidază decît tiogalactozil-transacetilază. Această situaţie nu este generală pentru toţi ARNm multigenici, deoarece ARNm pentru enzimele de metabolizare a galactozei, ARNm pentru enzimele sintezei triptofanului codifică toate enzimele corespunzătoare în cantităţi echimoleculare.

5. Reglarea sintezei de proteine prin inducţie şi represie. Progrese în cunoaşterea sistemului operon. Un nivel superior de control cantitativ al fluxului de informaţie în expresia genică este situat la prima treaptă a codificării, transcrierea. Considerînd codificarea unei proteine ca o cale metabolică simplă formată din două etape unidirecţionale, transcrierea-traducerea, şi conform principiului general al controlului cantitativ în care factorii reglatori acţionează la nivelul primei etape, atunci reglarea acestei căi metabolice trebuie să acţioneze la nivelul

Scanned with OKEN Scanner

transcrierii. Încă din etapa de pionierat a cercetării mecanismelor de inducție și represie ale sintezei de enzime prin acțiunea factorilor ecologici, Jacob și Monod au descris experimental și teoretic sistemul operon (1961) în care treapta de reglare a sintezei de proteine este transcrierea mesagerilor corespunzători. Luînd ca sistem de model experimental inducția și represia enzimelor de metabolizare a lactozei la *E.coli*, acești corifei ai geneticii moleculare au realizat un complex de studii experimentale și teoretice atît de apropiat de perfecțiune, încît constituie un îndreptar al gîndirii și metodicii în cercetare. Complexul lor de lucrări a deschis epoca cercetărilor moleculare în reglarea cantitativă la nivel genic iar genele codificatoare ale enzimelor de metabolizare a lactozei grupate în regiunea lac sînt atît de cunoscute, încît au devenit de mult obiect al articolelor de popularizare în ziarele cotidiene. Totuși pentru a minimaliza probabilitatea unor erori de interpretare care se ivesc în ardoarea schimburilor de opinii asupra tentativelor de extindere a conceptului operon și a inducției-represiei enzimatice, se impune o rememorare a datelor clasice stabilite în cadrul modelului experimental al sistemului lactoză (lac). Inducția și represia enzimelor constă din stimularea, respectiv inhibiția, sintezei *de novo* a enzimelor corespunzătoare și nu interesează activitatea acestor enzime gata sintetizate. Fie inducția, fie represia enzimelor care catalizează o cale metabolică unitară se dezvoltă în bloc pentru toate enzimele acelei căi, adică sînt procese de reglare coordonată. Genele codificatoare ale enzimelor de reglare coordonată, denumite gene structurale, sînt grupate adiacent într-o regiune genetică unitară și sînt transcrise în bloc într-o moleculă unitară de ARNm multigenic a cărui sinteză de transcriere începe la un sit genetic de inițiere denumit promotor. Acesta este un segment de ADN foarte apropiat genelor structurale și constituie situl-ligand pentru ARN-polimerază. Inducția și represia se realizează prin declanșarea transcrierii și respectiv oprirea transcrierii, mecanisme care se reflectă, prin codificare, asupra sintezei enzimelor corespunzătoare. Transcrierea și implicit sinteza enzimelor se află blocată datorită unei proteine difuzibile în citoplasmă, denumită represor, care se atașează specific la regiunea genetică și împiedică inițierea transcrierii, de aceea controlul cantitativ respectiv a fost numit reglare negativă. Legarea represorului are loc la un segment din regiunea genetică, diferit de promotor și de genele structurale și adiacent promotorului (fig. 69), denumit operator. Represorul este produsul de codificare al unei gene reglatoare care poate fi apropiată sau îndepărtată de genele structurale, iar cantitatea de represor pe celulă este foarte mică. Substratul căii metabolice (lactoza), cît și analogul acesteia — izopropil tiogalactozid (IPTG) — sînt specifici pentru represor și sînt liganzi alosterici; legarea lor în siturile din represor induce tranziții alosterice care fac inaptă molecula de represor de a mai interacționa cu operatorul;

Scanned with OKEN Scanner

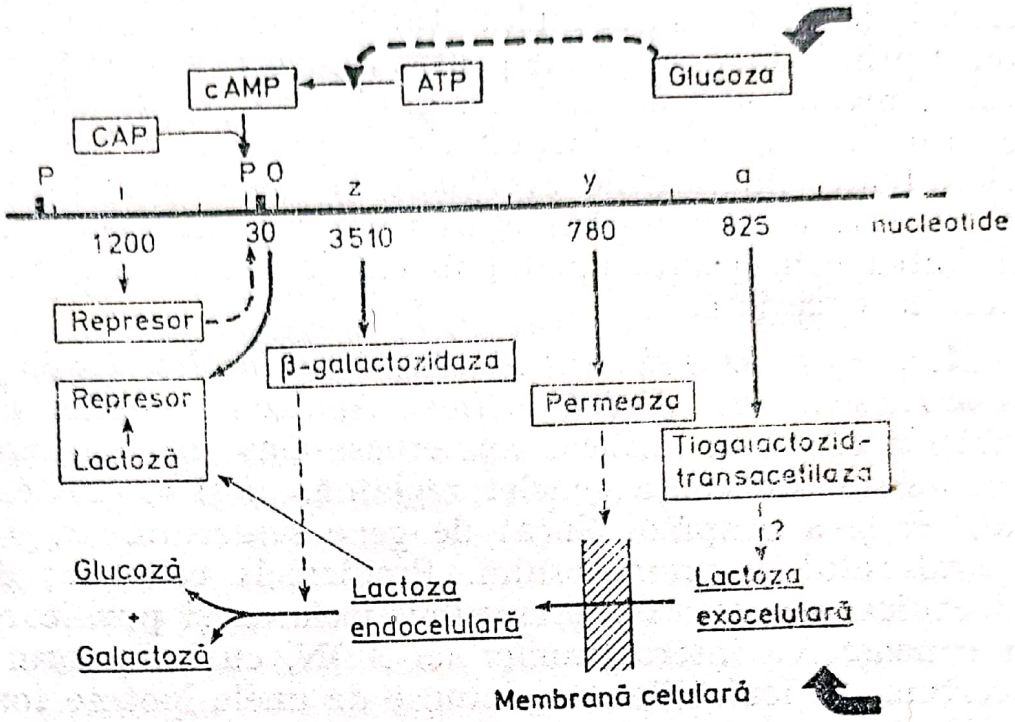


Fig. 69. **Operonul lac şi sistemul lac de metabolizare a lactozei.** Iniţierea transcrierii la nivelul promotorului (P) necesită acţiunea cAMP a unei proteine activatoare de catabolit (CAP) şi eliberarea operatorului (O) la care se află represorul fixat. Prin interacţiunea lactozei cu represorul acesta părăseşte operatorul şi transcrierea poate fi iniţiată. Adăugarea de glucoză în mediu inhibă întregul mecanism prin scăderea cAMP (efectul glucozei) (ilustrarea este inspirată din diferite lucrări din literatura citată în bibliografie).

represorul se desprinde şi permite transcrierea genelor structurale şi succesiv sinteza enzimelor corespunzătoare. Această acţiune se numeşte inducţie iar ligandul efector se numeşte inductor. Reglarea sintezei de proteine este genetic determinată de gene de control cantitativ, gena reglatoare şi operatorul, diferite de genele de structură. Unitatea de reglare constituită din promotor, operator şi genele structurale adiacente este numită operon. În alte cazuri, represorul este apt să blocheze operonul numai după interacţiunea cu un metabolit specific căii metabolice vizate în controlul operon, metabolit denumit corepresor. Totalitatea elementelor de reglare care condiţionează cantitativ funcţia unui operon se numeşte sistem operon (gena reglatoare, represor, inductor şi/sau corepresor, operon şi produsele de codificare: ARNm, enzimele căii metabolice) (fig. 69). Alterările mutaţionale care modifică fie viteza de transcriere şi de traducere, fie numărul de nucleotide din întregul operon, sau produc codoni nonsens, au un efect cu atît mai puternic, cu cît sînt mai apropiate de operator şi promotor; diferenţele cantitative mutaţionale în raport cu poziţia în operon sînt numite cu termenul „efect de polaritate" iar mutanţii sînt numiţi „de polaritate" sau polari. Aceste trăsături ale sistemului operon, reliefate pînă în 1963 prin cercetarea sistemului

Scanned with OKEN Scanner

Lac de la *E.coli*, au stimulat studiile asupra reglării sintezei de proteine prin inducţie-represie pentru a preciza existenţa reală a represorului, nivelul său de acţiune, gradul de generalizare al conceptului operon în reglarea sintezei diferitelor proteine la bacterii şi la celelalte vieţuitoare, implicaţiile eventuale ale sistemului operon în inducţia şi represia enzimatică la metazoare şi implicit la om şi mai ales aplicativitatea conceptului operon în explicarea mecanismelor de diferenţiere la eucariote.

1. *Confirmarea elementelor sistemului lac descrise de Jacob şi Monod şi a mecanismelor de interacţiune.* Analizele genetice de cartare (cap. XII) în care s-au utilizat numeroase clase de mutanţi (cap. XI) au demonstrat existenţa genelor reglatoare *i* şi *o*, existenţa promotorului, cît şi a grupului lincat de gene structurale *z*, *y* şi *a*, adiacent operatorului şi promotorului. Problemele cele mai dificile au fost identificarea naturii represorului, izolarea şi purificarea lui, precum şi cunoaşterea interacţiunilor cu ADN, cu inductorul şi cu analogii acestuia. Dificultăţile erau impuse de unele ipoteze formulate în anii 1963—1966, care presupuneau fie că represorul ar fi o moleculă de ARN, fie sugerau posibilitatea ca represorul lac, deşi proteinic, să interacţioneze cu ARNm lac şi să blocheze coordonat traducerea. Deoarece la *E.coli* de tip sălbatic represorul constituie numai 0,005% din proteinele solubile, pentru izolarea lui s-au preconizat două căi: a) cultivarea la scară industrială a unei cantităţi mari de bacterii producătoare şi utilizarea unei linii complexe de extracţii şi purificări; b) stabilirea unei metode genetice de „construire" a unei tulpini de *E.coli* care să producă de peste 1000 de ori mai mult represor decît tulpina de tip sălbatic. Folosirea primei metode a permis lui Gilbert şi Müller-Hill (1966) să izoleze cantităţi mici de represor, suficiente pentru a demonstra natura lui proteinică şi afinitatea sa mare şi discriminatorie pentru molecule de ADN purtătoare ale segmentului operator lac. Prin această performanţă s-au înlăturat discuţiile privind natura represorului şi nivelul său de acţiune în cadrul reglării operonice. Cea de-a doua metodă, perfecţionată de Müller-Hill şi colaboratorii săi între 1968 şi 1975, a constat din selecţia unui mutant la nivelul promotorului pentru gena *i* capabil să producă de 100 de ori mai mult represor. Ultima tulpină a fost infectată cu un bacteriofag cu următoarele proprietăţi: are încorporată gena *i* în genom şi devine după infecţie profag; din starea de profag poate fi indus prin cultivare la temperatură ridicată replicîndu-se şi multiplicînd şi gena *i*; este litic deficitar, deoarece în inducţie se multiplică numai genomul fagic, dar nu produce şi liza bacteriilor. Astfel se ajunge ca în aceeaşi celulă să existe o genă *i* care produce represor de 100 de ori mai mult şi o altă genă *i* multiplicată odată cu profagul indus, la 30—100 de copii. O astfel de celulă este capabilă să producă represor lac în cantitate de 7% din proteinele solubile în loc de 0,005%

Scanned with OKEN Scanner

cît produc celulele de *E.coli* cu care au lucrat Monod și Jacob. Ca urmare, în condiții medii de creștere bacteriană s-a ajuns să se obțină represor lac în cantități de ordinul gramelor, fapt care a permis secvențierea aminoacizilor din polipeptidele care-l alcătuiesc (Beyreuther și colab., 1973) și bineînțeles cunoașterea celorlalte proprietăți fizico-chimice și funcționale. Iată cîteva din aceste proprietăți: este o proteină tetramerică formată din subunități identice; o subunitate polipeptidică are 347 de aminoacili și 37 000 daltoni, ceea ce corespunde la o masă a întregii molecule de 148 000 daltoni; fiecare subunitate prezintă torsionări de tip α helix și folii β care cuprind 33—40% din lanț iar restul constă din inflexiuni terțiare mari care-i conturează o configurație globulară; structura cuaternară rezultă din agregarea a patru subunități globulare; pentru asocierea cuaternară sînt propuse două stări: starea baciliformă în care subunitățile sînt dispuse în șirag; forma „cuboidă" în care subunitățile sînt prinse una de alta și formează un paralelipiped cu muchii între 9,5 nm și 10,5 nm. Secvențierea aminoacidică a polipeptidelor de represor a demonstrat că acestea nu se aseamănă cu histonele, protaminele și alte proteine interactive cu ADN; de asemenea, nu s-a observat nici o asemănare cu secvențele aminoacidice din β-galactozidază, ceea ce infirmă ipotezele care presupuneau fie apropieri între histone și represor, fie originea genei reglatoare *i* dintr-un ancestral comun cu gena *z*. Fiecare subunitate de represor lac are următoarele regiuni funcționale: situl de legare de operator constituit din primii 60 de aminoacili ai extremității amino, dintre care aminoacilii 50—58 sînt esențiali pentru interacțiunea de recunoaștere a operatorului; situl de legare a inductorului a cărei mărime este incomplet delimitată; regiunea de transmisie situată între situl inductor și situl de operator și denumită astfel datorită funcției de a transmite alosteric transmolecular influența legării inductorului spre situl de operator; situl de agregare, cuprins în intervalul ultimilor 64 de aminoacili ai extremității carboxiterminale, constituie regiunea de interacțiune dintre subunități în alcătuirea structurii tetramerice cuaternare. Numeroase testări *in vitro* efectuate cu diferite specii de ADN au indicat că specificitatea de legare a represorului la operator este foarte mare iar interacțiunea este destul de puternică, deoarece are o constantă de disociere de 10^{-11}M — 10^{-13}M. Legarea de operator depinde de structura tetramerică, dimerii și monomerii nu interacționează cu operatorul. Capacitatea de legare de operator este instabilă și se pierde rapid în cazul purificărilor intense, în schimb proprietatea de a lega inductorul este foarte stabilă, nu se pierde nici după disocierea structurii cuaternare și nici după hidroliza enzimatică a mari porțiuni din extremitățile lanțurilor polipeptidice.

Segmentul operator din operonul lac este considerat ca porțiunea din ADN a regiunii lac interactivă cu represorul în așa măsură, încît

Scanned with OKEN Scanner

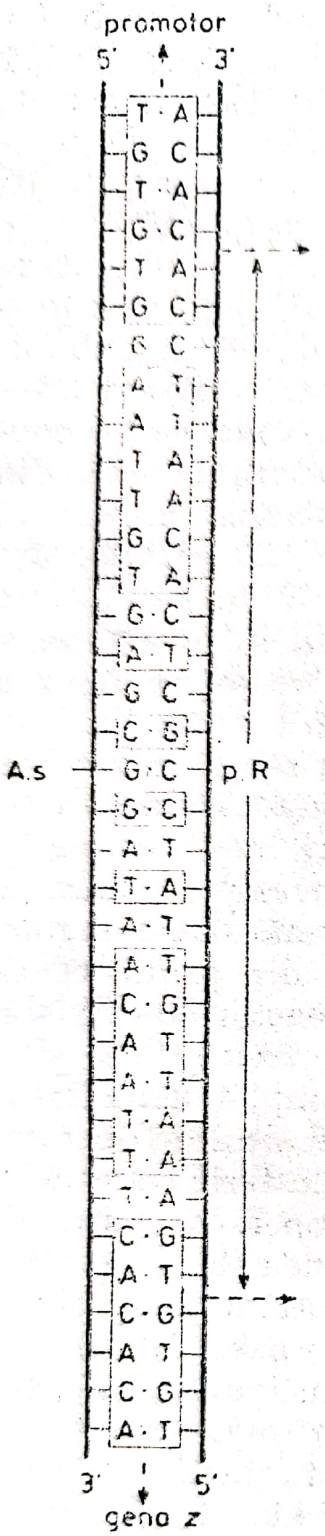


Fig. 70. Structura operatorului lac. Regiunile care manifestă simetrie rotatorie sînt boxate (după Müller Hill, 1975, cu modificări). A.s. = axul sau punctul de simetrie; p.R. = segmentul protejat de represor față de acțiunea DN-azei pancreatice.

este protejată de atacul DN-azei. Acest segment s-a dovedit a avea 25—30 de perechi nucleotidice a căror secvență a fost determinată (Gilbert și Maxam, 1973) (fig. 70). Secvențierea dezoxinucleotidică a demonstrat existența unei bisimetrii rotatorii a structurii bicatenare a operatorului. Prezența bisimetriei rotatorii, cît și disocierea termică mai facilă a structurii bicatenare a operatorului sugerează că struc-

Scanned with OKEN Scanner

tura acestuia poate fi steric convexă și conformă ipotezei lui Gierer (fig. 62 și 70).

Progresele efectuate în cunoașterea sistemului lac au confirmat deplin proprietățile și interacțiunile prevăzute de Jacob și Monod cu mult timp în urmă. Represorul interacționează cu ADN la nivelul operatorului și blochează transcrierea întregului operon și implicit provoacă represia sintezei enzimelor corespunzătoare. Inductorul recunoaște siturile de legare din represor și prin interacțiunea cu acesta îi induce o tranziție alosterică făcîndu-l inapt de a mai rămîne atașat de operator. Eliberarea operonului de represor permite inițierea transcrierii la nivelul promotorului urmată apoi de sinteza enzimelor interesate în sistemul de reglaj.

2. *Operoni de inducție și operoni de represie la bacterii și bacteriofagi ; efectul glucozei corelat cu inițierea transcrierii operonice.* Caracterele inducției enzimatice reliefate prin conturarea operonului lac și confirmate de izolarea, purificarea și analiza fizico-chimică a componentelor problemă, represorul și operatorul, constituie rezolvarea unui aspect important, și anume a inducției sintezei de enzime într-un sistem de reglare negativă. Cercetări referitoare la metabolizarea galactozei la bacterii au demonstrat existența unui operon gal care cuprinde genele de structură codificatoare ale enzimelor de transformare a galactozei în glucoză, cît și gene de reglare : un operator gal adiacent genelor de structură și o genă reglatoare *gal R* codificatoare a unui represor gal izolat, purificat și interactiv cu segmentul operator. Ca și în sistemul lac, mecanismul de reglare este negativ, în sensul că represorul singur blochează transcrierea operonului iar galactoza ca inductor desprinde, printr-un mecanism alosteric, represorul permițînd inducția sintezei de galactokinază, galactotransferază și galactozil-epimerază.

În aceeași măsură s-a observat că arabinoza, maltoza, ramnoza induc sinteza enzimelor necesare propriilor lor metabolizări (fig. 71). Toți operonii care pentru sinteza enzimelor pe care le codifică necesită acțiunea inductoare a unui metabolit specific au fost denumiți operoni de inducție sau inductibili. Spre deosebire însă de operonii lac și gal, inducția enzimatică pentru metabolizarea arabinozei în cadrul operonului ara are un mecanism de reglare pozitivă (Irr și Englesberg, 1970) în care proteina codificată de gena reglatoare *ara C* este represoare în absența arabinozei. Prezența arabinozei îi provoacă o tranziție alosterică și îi comută efectele, din represoare în efecte stimulatoare ale transcrierii (fig. 71). Aceleași comutări de reglare pozitivă au fost observate și pentru operonii codificatori ai enzimelor de metabolizare a ramnozei și maltozei. Corelat cu funcția operonilor inductibili în metabolizarea glucidelor a fost studiat un alt mecanism de control la bacterii, denumit represia catabolică sau „efectul glucozei". S-a observat că adăugarea glucozei scade sinteza enzimelor de metabolizare a lactozei, galactozei sau arabinozei, indusă în prealabil de

Scanned with OKEN Scanner

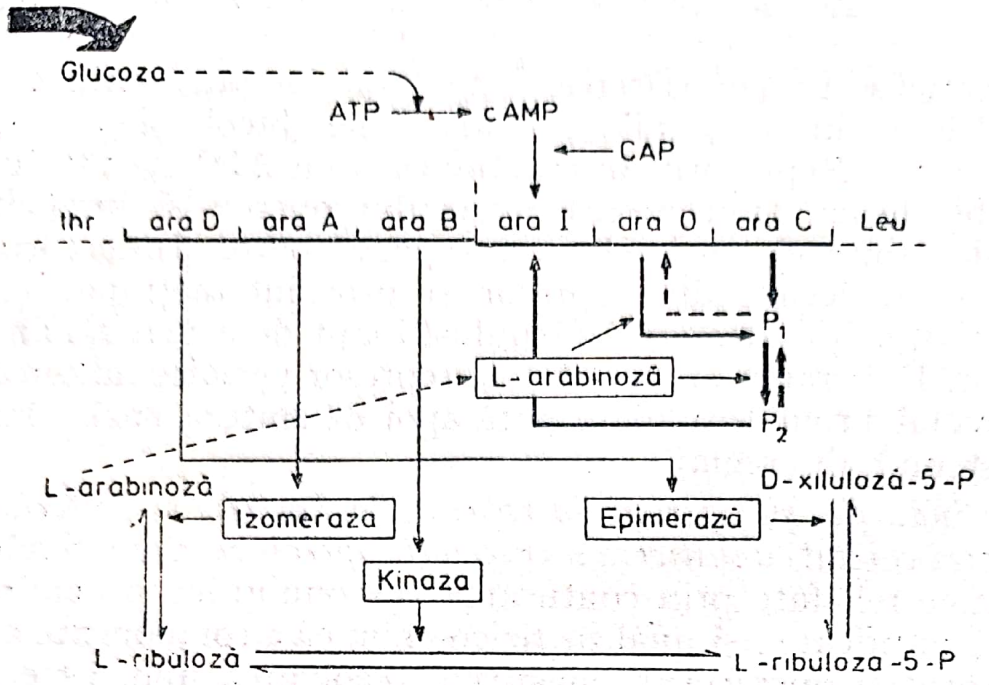


Fig. 71. **Operonul arabinoză, sistem de reglare pozitivă.** Arabinoza ca inductor activează represorul P1 pe care-l desprinde de operator (*ara*0) şi-l schimbă conformaţional în P2 activator. Sub această formă interacţionează cu ***ara I*** zona promotoare şi în prezenţa cAMP şi CAP (*catabolit activator protein*) deschid drumul ARN-polimerazei să transcrie genele structurale *araA*, *araB* şi *araD* codificatoare ale enzimelor izomeraza, kinaza şi respectiv epimeraza. Prezenţa glucozei scade sinteza de cAMP iar iniţierea transcrierii încetează chiar cînd arabinoza a activat P2. *AraC* este gena reglatoare producătoare de P1 (după descrierea lui Irr şi Englesberg, 1970).

metaboliţii respectivi. Fenomenul a fost demonstrat la majoritatea microorganismelor capabile să metabolizeze aceste glucide (Magasanik, 1957). Rămas un timp îndelungat fără explicaţie, efectul glucozei s-a dovedit corelat molecular cu reglarea transcrierii în sistemele inductibile. Adăugarea de glucoză scade nivelul intracelular de AMP ciclic, iar acest nucleotid este implicat în iniţierea transcrierii la nivelul promotorului (cap. IV). Interacţiunea nucleotid-promotor este mediată de o proteină monomeră de 45 000 daltoni denumită CAP (engl. *catabolite activator protein*). Ca urmare, în funcţia operonilor inductibili sînt implicaţi cAMP şi CAP care stimulează interacţiunea ARN-polimerazei cu promotorul în etapa de iniţiere a sintezei ARNm (fig. 70 şi 71). Scăderea intracelulară de cAMP prin adăugarea glucozei descreşte activitatea de iniţiere în transcriere, deşi operonii sînt eliberaţi de represori şi ca urmare inducţia enzimatică este anihilată.

Tot la bacterii aproape simultan cu operonii inductibili s-au descris operoni represibili. Aceştia constituie sisteme de control în sinteza enzimelor catalizatoare ale reacţiilor dintr-o cale metabolică în care nivelul cantitativ este asigurat de scăderea sintezei de enzime sub acţiunea produsului final al acelei căi. În acest caz produsul final recunoaşte specific represorul corespunzător inactiv, îi induce o tran-

Scanned with OKEN Scanner

ziţie alosterică şi-l face apt să recunoască operatorul sistemului represibil, motiv pentru care a fost numit corepresor. Ca urmare, în sistemele represibile represorii singuri sînt inactivi, operonii sînt transcrişi iar enzimele corespunzătoare sînt sintetizate. Creşterea concentraţiei de corespresor peste nivelul metabolic necesar stimulează alosteric represorul, acesta devine apt să se lege de operator şi blochează transcrierea. Astfel de sisteme represibile au fost descrise pentru căile de sinteză a histidinei şi a triptofanului (trp). La *E.coli*, *Salmonela* şi *B. subtilis* genele structurale pentru enzimele acestor căi sînt grupate în operoni şi transcrise în molecule unice de ARNm multigenic. Represia este coordonată, manifestă efectul de polaritate iar cantităţile de enzime sintetizate în derepresie sînt fie inegale (în sistemul his), fie echimoleculare (în sistemul trp). Semnificaţia biologică a inducţiei şi represiei coordonate prin cotranscrierea genelor implicate în aceeaşi cale metabolică ar consta în posibilitatea de a asigura controlul riguros al unei căi. Inducţia şi represia coordonată nu au constituit totuşi o funcţie majoră, deoarece în scara vieţuitoarelor mutaţiile tolerabile şi probabil translocaţiile recombinative au dispersat grupările genice cu reglaj coordonat. Chiar la nivel bacterian genele codificatoare pentru enzimele unor căi metabolice complexe nu mai sînt grupate, ci răspîndite în întregul genom. De exemplu, genele pentru cele opt enzime necesare sintezei de arginină sînt cuprinse în patru grupe situate în regiuni diferite, îndepărtate ale genomului bacterian. Cu toate acestea, ele sînt controlate de un singur represor arg, produs al unei gene reglatoare *arg R*, neadiacentă vreunui grup structural. Se admite că fiecare grup structural are cîte un operator sensibil la represorul stimulat de arginină drept corepresor, deşi identitatea dintre operatorii respectivi nu este obligatorie. Deşi transcrierea nu este coordonată ca în sistemul de tip lac, totuşi creşterea supraliminară a nivelului de arginină provoacă descreşterea sintezei tuturor enzimelor care o formează. Represia cooperată a sintezei de enzime codificate de gene fără cotranscriere are caracterele unui sistem unitar de reglaj care a fost numit reglon (engl. *regulon*).

La bacteriofagii ADN şi în domeniul plasmidelor bacteriene controlul coordonat este foarte răspîndit, aşa cum l-au descris Jacob şi Monod la fagul λ. Noile progrese în cunoaşterea morfopoezei fagilor şi în controlul stării de provirus au demonstrat însă complexitatea unei reţele de factori, subsegmente promotoare şi subdiviziuni de operator, în aşa fel că modelele simple propuse acum 10 ani sînt „neîncăpătoare" pentru explicarea controlului în dezvoltarea chiar a bacteriofagilor (fig. 75).

3. *Inducţia şi represia enzimatică la eucariote.* La eucariotele inferioare chiar operonii strict coordonaţi de la procariote îşi pierd caracterul de cotranscriere. De exemplu, la levuri, din cele 10 gene structu-

Scanned with OKEN Scanner

rale ale operonului his numai trei rămîn grupate; celelalte șapte sînt răspîndite în întregul genom.

Dacă mecanismul de reglare coordonată ar fi generalizat, ar trebui ca și la eucariotele superioare genele funcțiilor mai apropiate sau cel puțin genele aceleiași funcții să fie strîns lincate. Analizele genetice de cartare (cap. XII) au demonstrat însă că multe din genele codificatoare de lanțuri polipeptidice ale aceleiași proteine sînt situate în cromozomi diferiți (de exemplu, genele α și β pentru hemoglobine, genele *H* și *M* pentru LDH, genele imunoglobulinice). Totuși, la eucariote s-a constatat că inducția și represia enzimatică sînt întîlnite ca mecanism ubicuitar în răspunsul față de variațiile diferiților factori ai mediului intern și extern: variațiile concentrațiilor hormonale, modificări ale aportului nutritiv, schimbări ale tensiunii de oxigen, variații nictemerale, sezoniere și circanuale. Inducția enzimatică și represia la pluricelulare se desfășoară necoordonat. Cercetările experimentale îndreptate în această direcție nu au găsit molecule de ARNm multigenice iar cele mai multe observații indică fie un ARNm pentru o singură proteină, fie molecule diferite de ARNm pentru aceeași proteină cînd aceasta este formată din subunități eterogene. Avantajele inducției și represiei relativ independente pentru fiecare enzimă sau proteină sînt următoarele: a) controlul independent conferă un grad mai mare de flexibilitate a căilor metabolice în raport cu diversitatea celulară a eucariotelor multicelulare; b) controlul individual reduce consecința alterantă a mutațiilor polare, de la afectarea multienzimatică din cotranscriere la afectarea monoenzimatică (Hearst și Botchan, 1970). Aceste avantaje ar putea explica și faptul că în evoluția spre organismele multicelulare mutațiile și schimbările recombinative au acționat împotriva grupajelor operonice funcționale cu mecanism de cotranscriere genică. Grupajele cotranscrise ar fi fost prea rigide în condițiile homeostaziei mediului intern și ale diversificării celulare din diferențiere. Totuși în inducția și represia enzimatică de la eucariote modelul operon Jacob-Monod este extins prin celelalte trăsături: existența de situri promotoare pentru inițierea fiecărei transcrieri, existența posibilă de situri operatoare lincate de genele structurale, rolul proteinelor cromozomale nehistonice în reglarea transcrierii, rol asemănător celui îndeplinit de proteinele activatoare din sistemele inductibile cu reglare pozitivă de la bacterii. Diferențele ar consta în următoarele: la eucariote elementele de control se limitează în majoritate la reglarea unei singure gene structurale; în inducție și represie, factorii ecologici efectori din mediul extern acționează mediat prin sistemele de integrare neurohormonală; inducția și represia se desfășoară la nivelul unor celule diversificat specializate prin diferențiere.

Proteinele cromozomale nehistonice (PNH) sînt foarte eterogene (cap. XII), diferă de la un țesut la altul și în amestecul lor ar putea

Scanned with OKEN Scanner

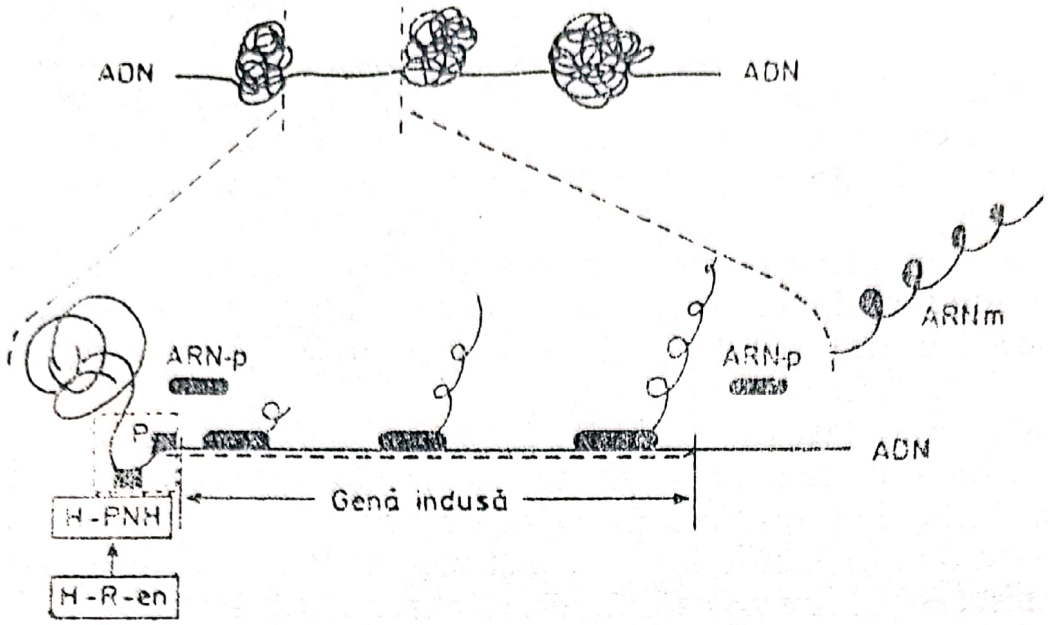


Fig. 72. **Inducţia expresiei genice sub acţiunea unui hormon** transportat de o proteină endocelulară (H—R-en) şi agregat apoi cu o moleculă de proteină cromozomală nehistonică (H—PNH). Acest complex interacţionează cu elemente promotoare (P) şi deschide drum ARN-polimerazei (ARN-p). Elementele promotoare constituie situl de „adresă". În partea de sus este reprezentată o moleculă de ADN cu unităţi de activare formate din porţiuni globulare şi porţiuni fibroase (diagramă inspirată din modelul Paul şi Gilmour, 1975).

cuprinde subunităţi de ARN-polimerază, represori, acceptori şi efectori de iniţiere a transcrierii (Paul şi Gilmour, 1975). PNH sînt considerate ca elemente de control în reglarea transcrierii la eucariote servind ca intermediari de acţiune a agenţilor fiziologici la nivel genic (Stein şi colab., 1974). În conformitate cu un model schematizat de Paul şi Gilmour în 1975, unitatea de reglare analoagă unui operon ar fi formată din situri de „adresă" asemănătoare promotorului, un sit de legare pentru represor şi gena structurală. Siturile de adresă sînt deblocate de acţiunea moleculelor PNH specifice activate de un inductor fiziologic (hormon), evenimente care deschid calea ARN-polimerazei pentru transcrierea genei structurale (fig. 72). Modelul de reglare cuprinde numeroase elemente din sistemul operon, iar efectorii fiziologici în inducţia sintezei de proteine sînt consideraţi hormonii.

4. *Efectele hormonilor şi conexiunile lor cu inducţia şi represia sintezei de enzime.* Spre deosebire de organismele monocelulare, la care sistemele de control al sintezei de proteine sînt conectate direct factorilor ecologici externi, la pluricelulare apare în mod necesar un mediu intern. Acesta, în evoluţie, este armat cu mijloace reglatoare capabile de a asigura constante homeostazice optime funcţiilor exercitate de multitudinea de celule diversificate prin diferenţiere. În condiţiile mediului intern ameliorat progresiv prin polimorfismul evolutiv celulele organismelor pluricelulare devin mai puţin depen-

Scanned with OKEN Scanner

dente față de condițiile externe, iar interacțiunea cu acestea din urmă este mediată de funcțiile integrative neurohormonale. Ca urmare, inducția și represia enzimatică, mecanisme de control la nivel celular al expresiei genice, constituie și la eucariotele pluricelulare forme de răspuns la acțiunea factorilor ecologici externi, cu deosebirea că declanșarea răspunsurilor celulare necesită reacțiile intermediare neurohormonale. Funcțiile integrative neurohormonale depășesc granițele geneticii moleculare, dar acțiunea celulară a hormonilor ca efectori în reglarea cantitativă a sintezei de enzime prin inducție și represie se impune a fi menționată într-un mod mai detaliat. Numeroase constatări experimentale acumulate din perioada clasică a biologiei moleculare și pînă în prezent demonstrează capacitatea hormonilor de a fi efectori în controlul nivelului de sinteză a proteinelor prin inducție-represie. 1) La plante, un exemplu edificator îl constituie inducția sintezei de α-amilază în semințele de orz pe cale de germinare. Embrionul secretă un hormon denumit acid giberelic care difuzează la nivelul celulelor aleuronice și induce formarea *de novo* a enzimei. α-amilaza trece în endospermul învecinat și metabolizează amidonul. Separarea mecanică a embrionilor de aleuron și endosperm împiedică producerea de α-amilază; adăugarea de acid giberelic aleuronului dezembrionat declanșează sinteza α-amilazei. 2) La insecte, neurosecreția primordială acționează asupra glandei protoracice care produce ecdison, un factor hormonal inductor pentru sinteza unei game largi de enzime care însoțesc metamorfoza: DOPA-decarboxilază, polifenol-oxidază, hidrolaze ale glandei salivare, coconază în celulele epiteliale. 3) La amfibieni, hormonii tiroidieni ca factori ai metamorfozei induc sinteza enzimelor participante în ciclul ureogen, sinteza serumalbuminelor la nivel hepatic, sinteza hidrolazelor (nucleaze, colagenaze) caudale. Aceiași hormoni represează sinteza de hemoglobină de tip larvar și induc producerea hemoglobinei amfibiene adulte. 4) La mamifere, administrarea de hormoni corticoizi crește sinteza hepatică de tirozin amino-transferază și triptofan-pirolază; triiodtironina are efecte inductoare în sinteza enzimelor hepatice, hormonii estrogeni induc creșterea sintezei proteinelor uterine, hormonii androgeni cresc sinteza proteinică în diferite țesuturi. În lista sumară a celor patru categorii de exemple se ilustrează că hormonii sînt efectori ai inducției enzimatice la nivel celular. Inducția cu hormoni constă în sinteza *de novo* a enzimelor interesate, deoarece administrarea de aminoacizi marcați radioactiv în perioada inducției duce la apariția de molecule enzimatice care au încorporat aminoacizii marcați. Prezența actinomicinei D ca inhibitor al transcrierii, sau a puromicinei ca inhibitor al traducerii, blochează inducția enzimatică prin hormoni.

Mecanismele moleculare ale acțiunii hormonilor ca efectori de inducție și represie enzimatică au fost studiate prin administrarea hormonilor *in vivo* și urmărirea sintezei proteinelor și acizilor nucleici

Scanned with OKEN Scanner

cît și cercetarea efectelor hormonale *in vitro*, asupra organelor izolate, fragmentelor de țesuturi, culturilor de celule, asupra agregatelor macromoleculare izolate, cît și a interacțiunii cu macromolecule purificate (acizi nucleici, proteine). Rezultatele experimentale sugerează existența a două modalități de acțiune a hormonilor : a) interacțiunea directă cu macromoleculele angajate în expresia genică consecutivă pătrunderii intracelulare ; b) acțiunea hormonilor prin intermediul sistemelor cAMP, cGMP și probabil al prostaglandinelor, neînsoțită de pătrunderea intracelulară.

a) *Interacțiunea hormonilor cu macromoleculele informaționale consecutivă pătrunderii intracelulare.* În acest model se admite că hormonii pătrund intracelular concomitent interacțiunii cu receptorii specifici, sînt transportați transcelular prin intermediul acelorași molecule receptor cu rol de translocatori și ajung să interacționeze cu moleculele de PNH (Kruh și colab., 1977). Aceste proteine sînt implicate în reglarea transcrierii și servesc drept intermediari ai acțiunii agenților fiziologici, implicit ai hormonilor, la nivel genic (Stein și colab., 1974) (fig. 72). Modelul se sprijină pe constatările experimentale obținute în studiul interacțiunilor dintre hormonii gluco-corticoizi și componentele cromatinei (Defer și colab., 1974; Kruh și colab., 1977), cît și al interacțiunii triiodotironinei cu receptori nucleari proprii și cu PNH (Samuels și Tsai, 1973; Thomopoulos și colab., 1974). Interacțiunile cu PNH sînt fie directe, fie prin intermediul activării unei proteinkinaze care fosforilează PNH folosind ATP ca donor de resturi fosforice. Interacțiunea fie directă, fie prin fosforilare activează PNH specifică iar aceasta din urmă promovează inițierea transcrierii și implicit a sintezei de enzimă vizată în mecanismul inducției enzimatice prin hormoni (de exemplu, inducția sintezei de tirozin aminotransferază hepatică sub acțiunea triiodotironinei). Modelul descris se referă în particular la hormonii cu moleculă mică, trăsătură care facilitează transportul transcelular : glucocorticoizii, hormonii tiroidieni, hormonii gonadali.

b) *Acțiunea hormonilor prin intermediul sistemelor cAMP, cGMP și al prostaglandinelor.* Pentru hormonii proteinici macromoleculari transportul transcelular este improbabil. Efectele lor asupra sintezei celulare de proteine sînt transmise prin sistemele cAMP și cGMP. Acești doi factori sînt sintetizați din ATP și GTP (fig. 73) sub acțiunea adenilciclazei și respectiv guanilciclazei, două enzime constituente ale membranei citoplasmatice (fig. 74). În stare de repaus, cele două ciclaze manifestă un nivel scăzut de activitate. Sub acțiunea hormonilor, activitatea lor se modifică : hormonii colinergici (insulina, prostaglandinele, oxitocina) scad sinteza de cAMP și cresc sinteza de cGMP ; hormonii adrenergici (glucagonul, ACTH, vasopresina, hormonul luteinizant) cresc sinteza de cAMP și scad sinteza de cGMP. Cei doi factori difuzează transcelular, acționează asupra

Scanned with OKEN Scanner

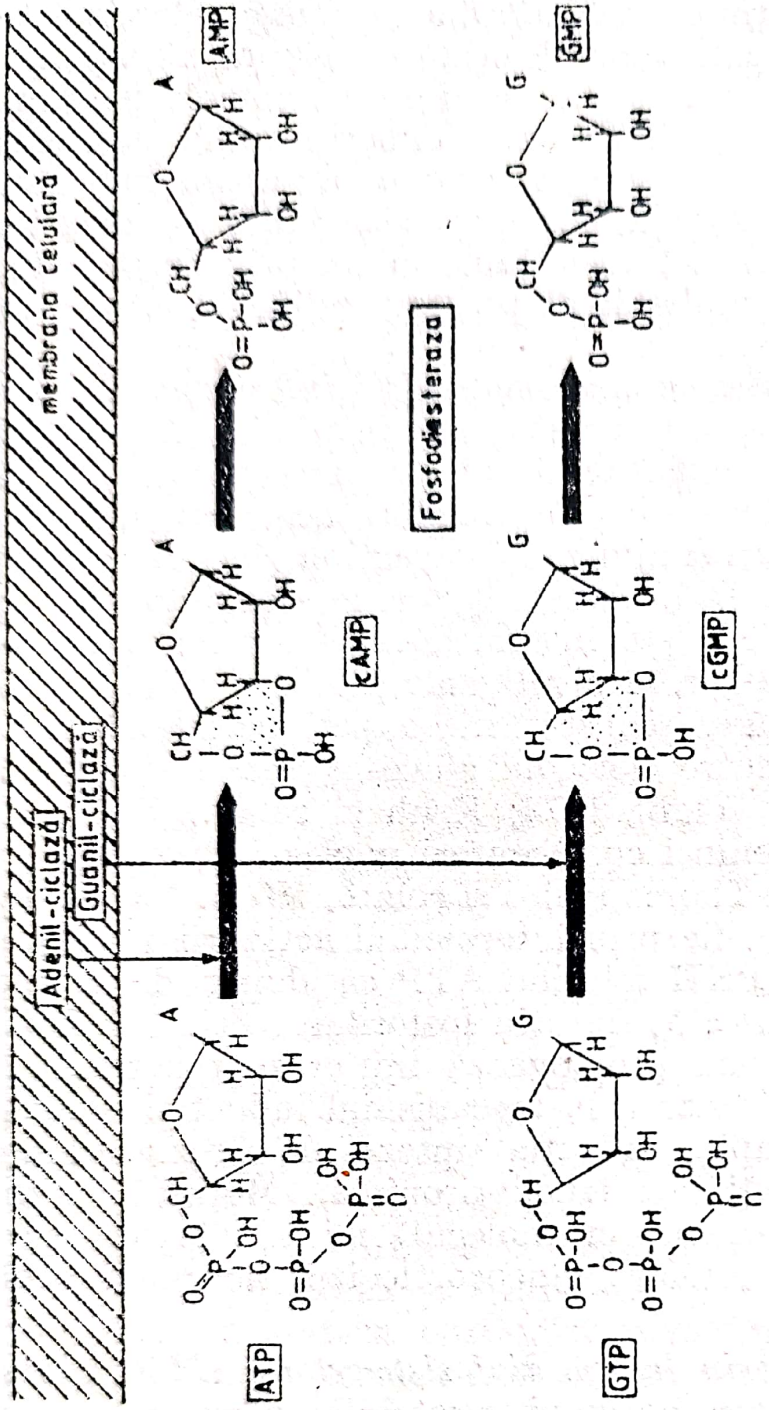


Fig. 73. **Sistemele cAMP şi cGMP** cu structurile ciclic-adenozin-monofosfat 5′—3′ (cAMP) şi ciclic-guanozin-monofosfat 5′—3′ (cGMP) şi sinteza lor din ATP, respectiv GTP. Desfacerea ciclului prin hidroliză şi formarea de AMP.

transcrierii şi traducerii şi modifică nivelul sintezei de proteine. Efectele hormonilor asupra sintezei cAMP şi cGMP sînt explicate în două moduri, după cum urmează: 1) *Ipoteza tradiţională*, în care unei molecule de ciclază, sintetizatoare comună de cAMP şi cGMP, i se atribuie situri receptoare pentru toţi hormonii. Astfel, nucleotid-ciclaza ar fi un agregat proteinic multimeric cu capacităţi alosterice, o parte din subunităţi fiind receptori hormonali iar celelalte subunităţi fiind catalitice. Interacţiunea cu hormonii induce variate tranziţii alosterice care modifică activităţile adenil-ciclazică şi guanil-ciclazică în funcţie de hormonul legat. Conform acestei ipoteze, ciclaza

Scanned with OKEN Scanner

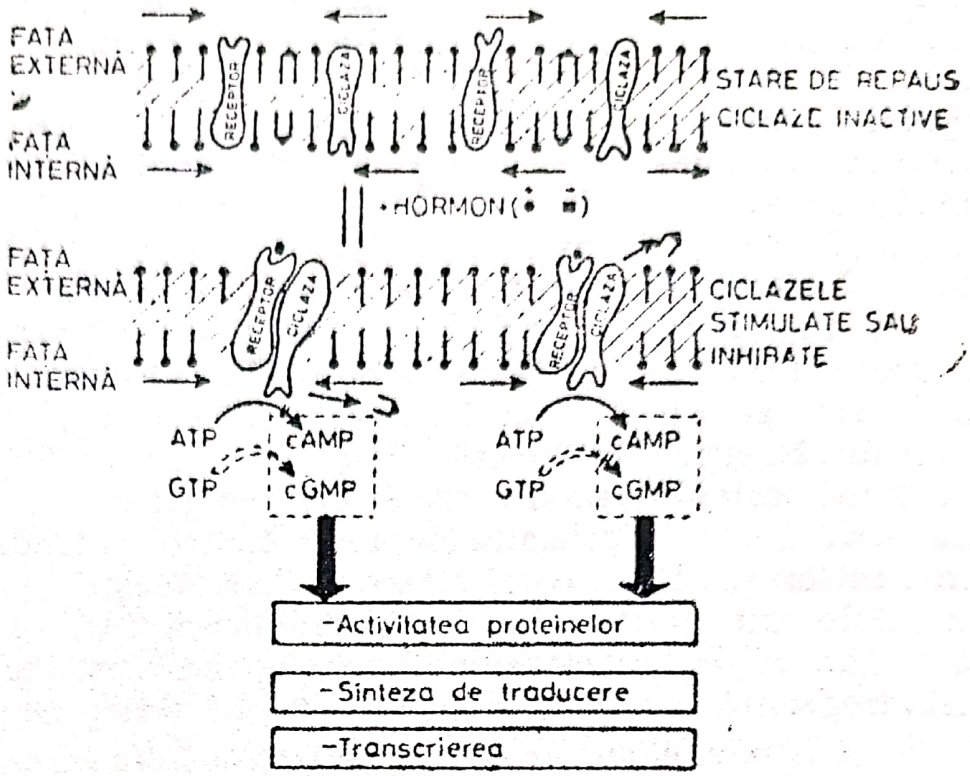


Fig. 74. **Modul de acțiune al hormonilor prin intermediul sistemelor cAMP, cGMP** și probabil al prostaglandinelor (schemă inspirată din modelul de acțiune propus de Cuatrecasas (1974). ⫯ = Molecule amfipatice lipidice ; ⋔ = resturi prostaglandinice.

din membrana adipocitelor ar trebui să cuprindă cel puțin 10 subunități diferite reactive pentru trei hormoni inhibanți ai sintezei de cAMP și șapte hormoni stimulatori ai aceleiași sinteze (Cuatrecasas, 1974). Contrar acestei ipoteze sînt datele care demonstrează existența unei guanilat-ciclaze de membrană dotată cu proprietăți alosterice și diferită de adenil-ciclază (Kimura și colab., 1975). Totodată, s-a demonstrat în repetate rînduri că receptorii hormonali sînt entități macromoleculare separate, cu masa de 200 000—300 000 daltoni, greu de imaginat a se aglomera stafiliform în jurul ciclazei și de a se afla orientați și spre suprafața membranei. 2) *Modelul dinamic al raporturilor receptori hormonali — ciclaze (Cuatrecasas, 1974)*. În structura semifluidă de membrană, receptorii hormonali și moleculele de ciclaze sînt entități separate care pot avea mișcări întîmplătoare conforme energiei libere. Eventualele întîlniri între receptorii liberi și enzime sînt nesemnificative. Dacă receptorii leagă hormonii corespunzători (fig. 74), aceștia induc schimbări conformaționale de receptori care devin apți să recunoască ciclazele. Ca urmare, complexele hormon-receptor interacționează cu ciclazele în întîlnirile intermoleculare și le stimulează sau le inhibă în funcție de specificitatea hormonală. Evenimentele de membrană ale interacțiunii hormon-receptor-ciclază modifică nivelele de cAMP și cGMP intra-

celulare iar ultimele condiționează inducția sau represia sintezei de enzime. În modelul de transmisie transcelulară a efectelor hormonale prin cAMP și cGMP pot fi cuprinse și prostaglandinele, ca factori lipoidici aflați în constituția membranelor, produși de toate țesuturile cercetate (Hinman, 1972). Prostaglandinele stimulează sinteza cAMP într-o serie de țesuturi (pulmonar, hipofizar, splenic, osos) și sînt implicate în modularea interacțiunilor de control dintre hormoni și celule. Răspîndirea ubicuitară a producției de prostaglandine este încă un argument pentru posibilitatea lor de a acționa ca mediatori în cooperare cu sistemele cAMP și cGMP. Oricum, sistemele de transmisie sînt sensibile și la hormonii micromoleculari care utilizează-ambele căi, atît cea directă, cît și calea sistemelor cAMP și cGMP. Pentru hormoni s-au descris efecte reglatoare nu numai la nivelul transcrierii, ci și la celelalte trepte de control al traducerii și activității proteinelor. Astfel, corticosteroizii pot crește sinteza de proteine în celule prin acțiune la nivelul traducerii (Allison, 1972; Staehelin și colab., 1977), iar estradiolul este ligand alosteric pentru glutamic-dehidrogenază căreia îi induce efecte alosterice negative.

5. *Alte mecanisme de control interpuse între transcriere și traducere.* Pe lîngă mecanismele de modulare ale activității proteinelor și sintezei de traducere, cît și mecanismele de tip operon, sînt descrise și alte modalități de control care se referă la compuși implicați în codificarea generală a proteinelor : a) controlul transcrierii diferitelor tipuri de ARN prin factorii participanți în complexul ARN-polimerazei ; b) controlul proceselor de prelucrare și maturare ale precursorilor macromoleculari ai ARNm, ARNr și ARNt ; c) controlul transportului nucleo-citoplasmic al diferitelor categorii de ARN. Aceste nivele de control transcriptiv sau intermediare între transcriere și traducere pot afecta sinteza proteinelor în totalitate. De exemplu, modificarea vitezei de reacție a ARN-polimerazelor conduce la schimbări cantitative în sinteza tuturor categoriilor de ARN, iar aceste schimbări se reflectă în sinteza de traducere a tuturor proteinelor.

6. **Controlul expresiei genice ca bază moleculară a adaptării viețuitoarelor la mediu.** Variațiile cantitative ale factorilor de mediu (temperatura, *p*H, concentrația ionică, aportul nutritiv, condițiile etologice) provoacă schimbări cantitative ale expresiei genice. Această caracteristică a factorilor de mediu a determinat să li se atribuie denumirea de efectori, deși pot fi mai curînd considerați fie cauzatori ai efectelor cantitative din expresia genică, fie semnale fiziologice (Monod și colab., 1963; Reissig, 1974). Acumulările de rezultate experimentale privitoare la mecanismele moleculare au demonstrat că semnalele fiziologice acționează fie direct, fie prin intermediul mecanismelor neurohormonale, la diferite nivele ale expresiei genice : activitatea unei proteine singulare, activitatea unei căi metabolice,

Scanned with OKEN Scanner

traducerea în sinteza proteinelor, nivelul genic al transcrierii. De exemplu, hormonii corticoizi cresc sinteza de tirozin amino-transferază acționînd fie ca inductori la nivel genic, fie ca stimulatori ai traducerii. Astfel de date aparent contradictorii au condus la negarea unor constatări neechivoce, deoarece se considera, de exemplu că existența unui control al traducerii exclude și necesitatea simultană a unui control transcripțional iar supozițiile au ajuns pînă la considerarea existenței de represori posttranscripționali în locul celor clasici, transcriptivi (Allison, 1972). Astfel, în ciuda datelor experimentale, nu se accepta ca o altă posibilitate coexistența a două sau mai multe mecanisme de control pentru sinteza aceleiași proteine. În realitate, toate modalitățile de control fundamentate experimental nu se exclud reciproc, ci împreună ar constitui substratul molecular al capacității de răspuns al organismului la variațiile cantitative ale factorilor de mediu, sau, cu alte cuvinte, constituie baza moleculară a adaptării. Raportat la caracteristicile agenților ecologici (natura, intensitatea, durabilitatea), controlul molecular trebuie să aibă mai multe calități, printre care rapiditatea, intensitatea, durabilitatea, reversibilitatea și aspectul economic. Pentru îndeplinirea acestor calități, prezența potențială a diferitelor forme de control la nivele diferite ale expresiei genice s-a impus cu necesitate, deoarece acestea diferă prin viteza de răspuns, prin amplitudine, persistență și nu se infirmă reciproc, ci se completează. Astfel, autoaccelerarea alosterică a unei enzime la primul contact cu substratul (ca factor ecologic) în concentrații semnificative este un mecanism de control elementar care se instalează în fracțiuni de secundă. Cînd cantitatea inițială de enzimă este insuficientă pentru a asigura intensitatea și durabilitatea solicitate de substrat, atunci intensitatea răspunsului și durabilitatea lui se amplifică prin creșterea sintezei de enzimă implicată în răspuns, fie mai rapid datorită mecanismului de stimulare la nivelul traducerii, fie mai lent, dar și mai durabil, prin inducția unui mecanism de tip operon. Acestea din urmă au o viteză mai lentă de răspuns, de ordinul minutelor sau orelor, dar cînd se instalează sînt intense (creșterea numărului de molecule de enzimă) și durabile atît prin moleculele de ARNm, cît și prin persistența enzimelor corespunzătoare. De fapt, mecanismele de modulare care vizează activitatea enzimelor au și fost numite „modalități de control pe termen scurt" iar mecanismele de inducție și represie enzimatică, „modalități de control pe termen lung" (Lynen, 1970).

Este posibil ca declanșarea întregului cortegiu de mecanisme reglatoare să depindă de cantitatea și amplitudinea cu care acționează agentul din mediu. Pentru o cantitate mică de substrat, autoaccelerarea alosterică este suficientă și celelalte mecanisme nu mai sînt declanșate. Dacă substratul este în cantitate mai mare și aportul de substrat persistă, atunci se declanșează mecanismele mai durabile

Scanned with OKEN Scanner

care ajung pînă la nivel genic. Asemănător se explică diversitatea de nivele la care s-a observat acțiunea hormonală. Hormonul poate fi efector alosteric direct pentru o enzimă interesată în control, acționează prin sistemele cAMP și cGMP pentru modificarea activităților unui ansamblu mai mare de molecule, la un nivel mai ridicat poate modifica traducerea unor molecule de ARNm gata sintetizate și în condițiile unei solicitări superioare acționează la nivel genic, transcripțional și chiar asupra replicării. Astfel, schimbările ecologice de durată, ca hipoxia de altitudine, eforturile fizice îndelungate ajung să declanșeze proliferări celulare și implicit replicări ale genelor interesate în răspunsul adaptativ (poliglobulia de altitudine cu replicarea concomitentă a genelor hemoglobinice, creșterea poliploidiei celulelor miocardice în hipertrofia cardiacă de efort).

Răspunsul cantitativ la nivele diferite de reglare în raport cu amplitudinea solicitării și durata acțiunii unui factor de mediu sugerează o ierarhizare în care nivelele diverse nu se exclud, ci se însumează. De exemplu, autoaccelerarea sigmoidală nu dispare dacă intervine și stimularea sintezei de traducere iar inducția prin transcriere nu scade stimularea traducerii. Ierarhizarea și cooperarea din controlul plurietajat realizează și aspectul economic al adaptării. La un nivel scăzut de solicitare răspund numai enzimele existente prin autoaccelerare sigmoidală suficientă pentru rezolvarea acestei solicitări și nu mai sînt declanșate celelalte etaje ale transferului informațional, energetic mult mai costisitoare. Aspectul economic al controlului molecular în adaptare este și mai bine ilustrat de mecanismul sistemului cAMP în efectul glucozei la bacterii. Inhibiția sintezei de enzime induse de lactoză și galactoză prin adăugarea glucozei și scăderea factorului comun cAMP (fig. 83 și 84) duce la economie metabolică. Metabolizarea lactozei și galactozei are ca rezultat final formarea de glucoză pe căi costisitoare (sinteză de ARNm, sinteză de enzime, activitatea enzimelor care utilizează ATP, UDP) aparținînd operonilor lac și gal. Prezența glucozei înlătură această cheltuială energetică prin scăderea cAMP și implicit blocarea transcrierii operonice. Scăderea degradării enzimelor reglatoare prin interacțiunea cu liganzi este un mecanism general care conduce la economii importante în mecanismul molecular al adaptării.

Din diferențele funcționale ale diferitelor forme de control al expresiei genice rezultă necesitatea delimitării termenilor conform diferitelor nivele · modulare pentru activitatea proteinelor și sinteza de traducere; inducție (derepresie) și represie pentru controlul sintezei de proteine la nivel transcripțional; degradare, termen sugestiv pentru mecanismul dinamic al limitării cantitative a nivelului intracelular de proteine. Aceste precizări permit și o considerare mai explicită a rețelei complexe și vaste alcătuite din mecanismele de control ca bază moleculară a adaptării.

Scanned with OKEN Scanner

7. Diferențierea ca mecanism de programare a expresiei genice la organismele pluricelulare. Dezvoltarea unui organism pluricelular, adică ontogeneza sa (gr. *on* = ce există, *gennan* = a da naștere), cuprinde ca procese fundamentale proliferarea, diferențierea și organogeneza. Diferențierea este o noțiune comparativă, deoarece se referă la un proces de diversificare desfășurat în cadrul unei mulțimi de celule în care acestea, deși au aceeași proveniență, diferă atît între ele, cît și față de celula din care au provenit. De exemplu, zigotul este diferit de celulele blastomere derivate din acesta, cît și de celulele țesuturilor adulte. Diversificarea celulară are ca substrat molecular sinteza de proteine diferite care duc și la expresii genice diversificate. Ca urmare, diferențierea semnifică procesul prin care celulele unui organism, deși au aceeași origine și același genom, ajung să sintetizeze proteine diferite și să exercite funcții diferite după un program ontogenic particular acelui organism. Studiile spectrelor proteinice sintetizate de diversele celule, cît și ale categoriilor de ARNm conforme codificării acestor proteine, au delimitat trei categorii de molecule: a) proteine și enzime ubicuitar prezente; de exemplu, lactat-dehidrogenaza este prezentă în toate țesuturile, organele și sistemele; b) proteine cu distribuție limitată la grupe tisulare mari; c) proteine unice, prezente la un singur tip celular, cum sînt: hemoglobinele, tubulina din neurofibrile, tirozin-aminotransferaza din celulele hepatice. Diferențierea interesează comutările programate care conduc la sinteza de tipuri unice de proteine și molecule de ARNm corespunzătoare acestora și nu implică proteinele bazale ubicuitar prezente. Mecanismele moleculare ale adaptării — ca modularea enzimatică, derepresia și represia enzimatică la nivel genic, controlul diferitelor etape de prelucrare ale ARN și proteinelor —, deși cantitativ diferite, nu sînt la originea diferențierii, ci se petrec la nivelul celulelor și țesuturilor gata diferențiate. Implicația mecanismelor de control cantitativ de tip adaptativ în procesul diferențierii a fost clasic formulată de Monod și Jacob (1961) în ipoteza derepresiei selective programate. În această ipoteză se admite că în celulele primordiale toate genele sînt represate iar derivarea de celule specializate în cursul proliferării ontogenice ar avea loc prin derepresii înlănțuite în circuite interconectate de operoni. Explicarea diferențierii prin control de tip adaptativ este improbabilă din următoarele motive: 1) Funcția specializată apărută prin diferențiere este ireversibilă iar reglajele adaptative sînt reversibile. De exemplu, niciodată precursorii eritrocitari nu pot deveni celule nervoase iar acestea din urmă nu pot deriva din celule epiteliale; 2) Diferențierile de înaltă specializare, ca în cazurile eritrocitului, neuronului, gameților, fibrei musculare striate, exclud diviziunea, pe cînd în reglările adaptative nu se cunosc exemple de excludere a multiplicării celulare; 3) Gradul de concentrare a funcției specializate realizat în diferențiere este foarte ridicat. De exemplu,

Scanned with OKEN Scanner

sinteza colagenului de către fibroblaşti creşte de 10^4 ori faţă de sinteza colagenică iniţială din fibroblaştii prezumtivi, cantitatea de hemoglobină creşte de 10^6 ori în eritrocitul matur faţă de precursorul cap de serie în hematopoeză. Reglarea adaptativă nu depăşeşte un plafon de 60 de ori în inducţia hormonală iar inducţia adaptativă la bacterii nu creşte sinteza de enzime mai mult de 600 de ori faţă de cea iniţială ; 4) În multe procese de diferenţiere, nivelul cantitativ al proteinelor unice, raportat la greutatea celulei specializate, atinge valori excesive. De exemplu, celulele secretorii produc proteină de export care depăşeşte cantitativ cu mult greutatea celulei producătoare ; 5) În limitele variaţiilor ecologice care nu produc efecte letale diferenţierea este relativ independentă de mediul extern, pe cînd reglările adaptative au loc în strînsă dependenţă de condiţiile ecologice.

1. *Diferenţierea este un proces de activare-inactivare genică endocelulară amplificat de diferitele nivele de control adaptativ.* Dacă nici derepresia-represia, nici reglarea traducerii şi celelalte procese modulatorii nu pot fi implicate în originea diferenţierii, atunci pentru diversificarea expresiei genice se pot folosi termenii de activare şi inactivare genică specifică prin factori specializaţi, activatori şi inactivatori (Davis şi Adelberg, 1973). Activarea şi inactivarea constau din procese de deblocare, respectiv blocare funcţională, pretranscriptivă, selectivă şi stabilă a genelor prin factori specializaţi de mare diversitate şi cu un grad ridicat de programare în producerea şi distribuirea lor genomică. Activarea genică este endogenă şi nu este indusă de factori exocelulari. Reglările adaptative se produc la nivelul celulelor diferenţiate şi secundar activării genice. De exemplu, tirozin aminotransferaza este produsă numai de hepatocit. La acest tip celular, deşi gena pentru enzimă este activată, nivelul de sinteză este scăzut. Tratamentul cu glucocorticoizi creşte sinteza de enzimă de aproximativ 60 de ori, dar numai la nivelul hepatocitului, deşi toate celulele nucleate prin definiţie au gena pentru tirozin amino-transferază. Oricum, mecanismele diferenţierii nu sînt elucidate iar ipoteza activării şi inactivării genice pretranscriptive, cît şi celelalte ipoteze care implică mecanisme de reglare transcriptivă şi postranscriptivă sînt dezbătute şi considerate, în literatura recentă, la un loc. Din aceste motive, mulţi autori nu fac distincţie între noţiunile de derepresie-represie, modulare, activare şi inactivare, le substituie una cu alta, sau le folosesc mixt, de exemplu activare-represie.

2. *Ipotezele programării temporale în diferenţiere.* Ontogeneza unui organism are o desfăşurare în care mecanismele diferenţierii şi reglărilor cantitative controlează momentele expresiei genice şi programează ordinea de codificare a diversităţii informaţionale depozitate în genom. Pentru explicarea programării temporale în geneza diversităţii celulare din ontogeneza timpurie sînt două modele extreme (Rutter şi colab., 1973; Holtzer şi Rubinstein, 1977): a) mo-

Scanned with OKEN Scanner

delul totipotenței inițiale cu inducții progresive exocelulare; b) modelul deciziei binare prin cicluri celulare de cantificare (engl. *quantal cell cycles*).

a) *Modelul omnipotenței inițiale cu inducții progresive exocelulare care conduc la diferențierea terminală.* Se admite că celula inițială (zigotică) este nediferențiată, totipotentă, are o multivalență metabolică și toată cantitatea de ADN ar fi transcriptibilă. Starea totipotentă durează pînă cînd diviziunile celulare de clivaj produc o mulțime celulară cu un micromediu exocelular care cuprinde acea mulțime. Fiecare celulă este încă multipotentă și presupune o plasticitate bazală foarte mare. Căile pe care aceste celule multipotente le urmează sînt căi ireversibile de inducție exocelulară de noi potențiale, celulele devenind progresiv pluripotente și apoi unipotente. În consecință, noile potențiale sînt determinate de factori inductori bogați în informație cu acțiuni de contiguitate intercelulară care determină regiunile genetice de transcris. Evoluția spre potențiale diversificate produce micromedii variate care induc divers spre specializare terminală ireversibilă. În acest model gradele din ce în ce mai intense de diferențiere se succed în cascadă. Programatorul temporal și complexul de control al diversificării este micromediul (sau mediul intern) în care celula proliferează. Între diferite tipuri celulare din fazele multipotente sau pluripotente pot exista tranziții frecvente prin simpla modificare a micromediului (Holtzer, 1977). Acest micromediu inductor pentru diferențierea unui grup celular specializat este constituit din: influența inductoare a țesuturilor vecine, numită inducție de contiguitate, factori inductori locali difuzibili din aproape în aproape; migrarea celulară; complexele de joncțiune intercelulară, lamina bazală care compartimentează regiuni embrionare, acțiuni hormonale, migrări celulare, factori de creștere celulară pentru diferențierea terminală (Rutter și colab., 1973). Sinteza de ADN și ciclurile celulare de diviziune au rol exclusiv de proliferare, de a oferi materia primă diferențierii, cu alte cuvinte de a asigura mulțimea necesară de celule pentru diferențiere. În acest model, opțiunea metabolică a specializării nu pornește din celula sediu a specializării, ci este indusă exocelular iar sinteza ADN și diviziunea nu au nici un rol în generarea diversității celulare (tabelul 12).

b) *Modelul deciziei binare prin cicluri de cantificare.* Toate celulele, indiferent de stadiul de ontogeneză, sînt diferențiate avînd o expresie genică specifică și nu există diferențe de potențial, deoarece celulele sînt genomic egale, în consecință nu există celule omnipotente, multipotente, pluripotente sau unipotente, fiecare celulă își are o opțiune metabolică proprie luată intrinsec la nivel intracelular și neindusă de micromediu. Schimbările sînt datorate elementelor genomice intrinsece de programare iar regiunea limitată din genom făcută aptă pentru transcriere în orice celulă este rezultanta integrată a antece-

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 12

Ilustrarea trăsăturilor bazale ale celor două modele extreme de programare a diversităţii celulare în diferenţiere

Modelul multipotenţei primordiale şi al diferenţierii instructive prin factori exocelulari	*Modelul deciziei binare prin cicluri de cantificare cu determinism endogen şi segregare în aliniamente.*
Celulele primordiale sînt nediferenţiate şi multipotente.	Toate celulele sînt diferenţiate, indiferent de etapa ontogenetică.
Celulele individuale au mare multivalenţă metabolică şi aproape toată cantitatea de ADN capabilă de transcriere.	Fiecare celulă are o porţiune limitată din genom, specifică ei, cu capacitate de transcriere.
Regiunile transcrise şi netranscrise la un tip celular sînt determinate de factori exogeni acelui tip celular.	Porţiunea transcriptivă din genom este determinată endogen ca funcţie a genomului propriu fiecărei celule.
Factorii exocelulari formează micromediul inductor de diferenţiere.	Inducţia exocelulară este secundară şi doar amplifică decizia programativă intracelulară.
Sinteza ADN şi diviziunea celulară au numai rolul de a asigura mulţimea celulară necesară diferenţierii.	Ciclurile celulare şi sinteza de ADN sînt direct implicate în diversificare existînd cicluri de cantificare în care se realizează decizia programativă a regiunilor de transcris.
Celulele embrionare au o plasticitate bazală inerentă sau instabilitate în opţiunile metabolice	Orice celulă îşi are o opţiune metabolică stabilă care este o funcţie a trecutului său mitotic, deoarece de timpuriu celulele segregă în aliniamente prin decizii binare succesive.
Simple modificări de micromediu pot provoca tranziţii între tipuri celulare.	Tranziţiile între tipuri celulare sînt evenimente foarte rare ; pot apărea numai după o lungă activitate mitotică producătoare a unei populaţii îndeajuns de mari pentru probabilitatea tranziţiei.
Diferenţierea terminală în celule producătoare de proteine unice este rezultatul unei succesiuni de molecule unice în micromediu cu capacităţi instructive determinante, inductoare sau evocatoare.	Geneza fenotipului terminal este rezultatul unei succesiuni de decizii binare endogene concomitente ciclurilor cantificatoare în cadrul aliniamentelor ; codificarea proteinelor unice rezultă din succesiunea compartimentală a aliniamentelor corespunzătoare lor.

Scanned with OKEN Scanner

dentelor ontogenice mitotice ale tipului celular luat la un moment dat în considerație (tabelul 12). Ca urmare, în acest model, preconizat de Holtzer și Rubinstein (1977), ciclurile celulare din procesul proliferării sînt esențiale pentru opțiunile metabolice diferite din diversificarea celulară. Modelul implică două tipuri de cicluri celulare: 1) cicluri celulare de tip proliferativ în care opțiunile metabolice ale celulei mamă sînt transmise ca atare, nemodificate la celulele fiice; 2) cicluri celulare de cantificare în cadrul cărora se realizează intrinsec o nouă opțiune metabolică diferită de cea a celulei mamă. Această nouă opțiune este prezentă fie la o singură celulă, fie la ambele celule fiice. Deoarece din orice ciclu celular rezultă două celule, în ciclul celular cantificator se realizează decizia față de două eventualități, pentru cel puțin una dintre celulele fiice: fie să rămînă la aceeași opțiune metabolică existentă în celula mamă, fie să se realizeze decizia programativă pentru noua opțiune metabolică. De aceea decizia programatică pentru opțiunea metabolică este numită decizie binară. Pentru ca un ciclu să fie de cantificare este obligatoriu ca fie una, fie ambele celule fiice să opteze pentru noua calitate metabolică. Celula fiică posesoare a noii opțiuni metabolice generează un compartiment celular a cărui mărime depinde de numărul ciclurilor proliferative. Delimitarea unui compartiment celular este dată de ciclurile cantificatoare. Deciziile pentru opțiuni metabolice noi sînt dependente de ciclurile cantificatoare apriorice, de aceea se afirmă că regiunea din genom făcută aptă pentru transcriere (opțiunea metabolică) este rezultanta antecedentelor mitotice ale unei celule date. În acest model se presupune că prin decizii binare intrinsece în cadrul ciclurilor cantificatoare primordiale se formează aliniamente de compartimente (engl. *lineage*) din primele momente ale ontogenezei. Tranziția de la un compartiment la altul în cadrul unui aliniament este dependentă de ciclurile cantificatoare și au ca rezultat o succesiune de fenotipuri tranzitorii în cadrul aceluiași aliniament. Fenotipul este tranzitoriu în funcție de succesiunea ciclurilor cantificatoare, dar este stabil în cadrul aceluiași compartiment. Se presupune că substratul molecular al unui ciclu cantificator constă în faptul că trecerea printr-un astfel de ciclu face posibilă transcrierea actuală a unei regiuni din genomul celulei fiice care nu era transcriptibilă în genomul celulei mamă. Modelul deciziei binare prin cicluri de cantificare implică direct în programarea diversificării celulare din diferențiere sinteza de ADN și proliferarea celulară. Totodată subliniază că diversificarea și specializarea celulară sînt determinate genomic intrinsec și nu reprezintă o succesiune de evenimente de conjunctură exocelulară prin inductori, evocatori sau hormoni, factori constituenți ai mediului în care are loc diversificarea. Factorii de mediu intern au numai rolul de amplificatori ai opțiunilor metabolice luate în ciclul cantificator prin decizie binară. Spre deosebire de mo-

Scanned with OKEN Scanner

delul celulelor nediferenţiate multipotente, modelul ciclurilor de cantificare nu acceptă plasticitatea bazală multipotentă, considerînd că între aliniamentele compartimentale nu există tranziţii chiar de la începutul delimitării lor prin cicluri cantificatoare.

3. *Cele două modele ale diversificării programate faţă de activarea genică endogenă ca bază moleculară a diferenţierii.* Cercetarea diferenţierii este dominată de modelul multipotenţei primordiale şi al inducţiei progresive a opţiunilor metabolice pe măsura diversificării şi specializării (Rutter şi colab., 1973). Admiţînd acest model în continuare în termeni moleculari, ar trebui ca o celulă primordială multipotentă să aibă un mare număr de programe de transcriere, în aşa fel ca un blastomer, de exemplu, să aibă mai multe potenţialităţi transcriptive decît progenii lor ontogenici mai apropiaţi sau mai îndepărtaţi. Dar, aşa cum subliniază Holtzer şi Rubinstein (1977), nu există vreo experienţă prin care să se demonstreze că miozinogeneza, de exemplu, să fie mai pregnant programată pentru codificare în zigot, morulă sau blastulă decît în celulele proliferative din măduva hematopoetică sau din epiteliile intestinale. În schimb, dacă se consideră modelul ciclurilor de cantificare şi al aliniamentelor celulare prin decizii binare, acesta pare a fi mai potrivit unei programări moleculare a expresiei genice. Conform modelului prin decizii binare asupra transcrierii de regiuni genetice de mărimi asemănătoare, într-un ciclu de cantificare primordial se realizează activarea genică pentru două fenotipuri celulare distincte, după două cicluri de cantificare patru fenotipuri, la trei generaţii de cantificare 8 fenotipuri, această succesiune în aliniamente ajungînd la diversitatea fenotipică terminală, cînd se iniţiază programe de activare pentru codificarea de proteine unice. Opţiunile fenotipice de la diferite compartimente timpurii ale aliniamentelor nu se cunosc şi implicit nu se cunosc nici regiunile genetice timpuriu activate. Astfel, o problemă biomoleculară importantă pentru diferenţiere constă din a cunoaşte şi carta opţiunile metabolice genetic activate pentru fiecare celulă luată singular, sau cel puţin pentru compartimente celulare a căror opţiune metabolică este de acelaşi fel. Această precizare ar putea stabili natura activării genice şi specificitatea ei pentru evenimentul programatic din fiecare tranziţie de diversificare binară în cadrul ciclurilor de cantificare.

4. *Histonele şi proteinele cromozomale nehistonice (PNH), inactivatori şi respectiv activatori genici.* În lumina modelului deciziei binare prin cicluri de cantificare şi aliniamente compartimentate, baza moleculară a comutărilor expresiei genice în diferite cicluri cantificatoare poate fi considerată ca o succesiune de inactivări şi activări genice cu programare endogenă. Inactivarea genică poate fi realizată ipotetic pe două căi, fie prin excludere fizică a genelor din genomul pe cale de diversificare, fie prin blocare funcţională stabilă. Prima cale

Scanned with OKEN Scanner

este improbabilă, deoarece ar duce la scăderi semnificative din cantitatea de ADN la celulele nucleate cu diferențiere terminală, procese care nu au fost observate în majoritatea cazurilor. În deblocarea și blocarea funcțională a genelor sînt implicate PNH și respectiv histonele.

a) *Inactivarea genică prin histone.* Procesul se datorează capacității acestora de a se agrega cu segmente de ADN și de a forma complexe nucleozomice (cap. VII). Histonele sînt factori inactivatori nespecifici, deoarece au capacitatea de a se complexa cu ADN de proveniență diversă, chiar cu ADN bacterian. Efectul inactivator al histonelor depășește chiar nivelul de organizare al ADN, deoarece astfel de policationi naturali au efect inactivant și asupra celulelor bacteriene întregi (Hirsch, 1958), cît și asupra transformării genetice la bacterii (Antohi și Popescu, 1979). Inactivarea genică funcțională se explică prin faptul că histonele sînt inhibitori ai reacțiilor biochimice legate de replicarea și transcrierea ADN, cît și a interacțiunii dintre ADN și diverse nucleaze. Pentru edificare se menționează cîteva rezultate: a) replicarea ADN din heterocromatina bogată în histone este mai tîrzie decît replicarea ADN din eucromatină; gonozomul X picnotizat sub formă de corpuscul Barr în cea mai densă stare de heterocromatinizare intră în replicare ultimul; b) zonele heterocromatice dense bogate în histone nu manifestă procese de transcriere, afirmația se bazează pe faptul că acestea nu încorporează uridină marcată radioactiv (uridină tritiată); regiunile eucromatice sărace în histone sînt foarte active în transcriere; c) complexarea *in vitro* a histonelor cu ADN împiedică accesibilitatea ADN-polimerazei la matrițele moleculare și inhibă replicarea; îndepărtarea histonelor de pe aceleași molecule permite începerea replicării. S-a observat și o ierarhizare în efectul blocant al replicării, în sensul că fracțiunile bogate în lizină sînt mai inactivante decît cele bogate în arginină; d) îndepărtarea histonelor din complexele heterocromatice lipsite de transcriere permite accesul ARN-polimerazei și inițierea transcrierii pe matrițele ADN dehistonizate; e) clivajul histonei în două fragmente și complexarea separată cu molecule de ADN au dovedit că fragmentul carboxi terminal este mai inhibitor asupra replicării și transcrierii iar fragmentul aminoterminal inhibă numai ADN-polimeraza; f) reconstituirea de complexe cromatiniene din ADN și histone izolate împiedică accesul endonucleazelor restrictive la nivelul ADN; g) protaminele și histonele inhibă transformarea genetică la bacterii. Aceste cîteva rezultate experimentale indică efectul blocant al histonelor asupra reacțiilor de replicare, de transcriere și de recombinare, procese moleculare de bază în proliferarea celulară, în expresia genică și respectiv în variabilitatea prin recombinare.

Procesul de inactivare este ireversibil și constă într-o lipsă totală de răspuns al genei, regiunii genetice sau cromozomului implicat. Genele inactivate sau cromozomii inactivați nu răspund la factorii

Scanned with OKEN Scanner

care solicită expresia genică, nici la factori exocelulari (hormoni, inductori, evocatori), nici la factori intrinseci (represori, proteine de reglare pozitivă). Inactivarea este permanentă, se transmite în succesiunea de generaţii ontogenice celulare asemănător schimbărilor mutaţionale (Lyon, 1974). De aceea, histonele singure par totuşi insuficiente pentru un proces atît de profund. Pentru inactivare sînt sugerate mecanisme care să implice schimbări chimice de excluzie funcţională a genelor structurale, fie prin fragmentarea lor şi refacere cu inserţie interpusă de segmente migratoare de inserţie (transpozoni), fie prin modificări ale elementelor iniţiatoare în transcrierea genelor vizate (promotorul sau situl de adresă al genei de inactivat).

b) *Activarea genică prin PNH.* Acest grup de proteine participant în alcătuirea cromozomilor metafazici şi răspîndit în masa cromatiniană din interfază s-a dovedit a fi cel mai eterogen şi în consecinţă şi cel mai potrivit pentru activări specifice de gene. Eterogenitatea mult mai mică a histonelor a exclus de la început ipotezele potrivit cărora histonele ar putea constitui inactivatori specifici. Studii numeroase asupra PNH au demonstrat că ele constituie un amestec de proteine interactive cu ADN, pot cuprinde o seamă de activităţi enzimatice care fosforilează sau acetilează histonele, cuprind factori participanţi în complexul ARN-polimerazei, fracţiunile lor electroforetice variază de la un ţesut la altul şi prezintă fracţiuni minore ale căror molecule sînt în număr mic la aceeaşi celulă (Paul şi Gilmour, 1975; Dewair şi colab., 1976; Walker şi colab., 1976). Mai mult, s-a demonstrat că spectrele electroforetice au analogie de organ şi mai puţin de specie. De exemplu, spectrul PNH de ficat aviar este mai asemănător celui hepatic de la şobolan decît spectrului reticulocitar de la galinaceae (Barret şi Gould, 1973). Pentru diferite fracţiuni de PNH s-a demonstrat că au capacitatea de a recunoaşte secvenţe specifice de ADN şi că porţiunile din genomii celulari sărace în histone şi angajate în codificare sînt complexate cu PNH. Activarea genică de tip terminal în diferenţiere pare să implice molecule de PNH de specificitate intrinsecă celulară, deoarece genele ireversibil inactivate dintr-un ţesut pot fi activate pentru transcriere de molecule de PNH din alt ţesut în care aceleaşi gene sînt activate. De exemplu, Paul şi Gilmour (1975) au demonstrat că genele hemoglobinice din cromatina izolată a ţesutului eritroid de şoarece pot fi transcrise *in vitro* de ARN-polimerază. Aceleaşi gene din cromatina ţesutului nervos nu pot fi transcrise. Dacă se efectuează însă reconstituire de cromatină de creier în prezenţa de PNH din ţesut eritroid, atunci genele hemoglobinice din cromatina de creier sînt transcrise în ARNm hemoglobinic. Prin urmare, genele hemoglobinice nu sînt modificate ireversibil la nivelul nucleilor neuronali, iar fracţiunile PNH cuprind activatori cu specificitate de tip celular diferenţiat. Rezultatele lui Paul şi Gilmour pledează pentru păstrarea intactă a genelor inactivate şi

Scanned with OKEN Scanner

aparent sînt mai puțin potrivite cu ipoteza modificării ireversibile a genelor diferențiat inactivate prin inserție de fragmente migratoare de ADN de tip inserton sau transpozon descrise la bacterii (cap. XIII).

Mecanismele moleculare ale activării ar consta din recunoașterea segmentului de ADN de activat, debarasarea lui de histone prin fosforilarea cu ajutorul unei histono-ATP-kinaze cuprinse tot în amestecul PNH și angajarea lui în transcriere.

Stabilitatea activării ar putea fi asigurată de modificarea segmentului de ADN activat prin metilare, așa cum sugerează Riggs (1975). Autorul menționează că gonozomul X activat conține ADN mai bogat metilat iar cel inactivat este submetilat. În structura ADN de la eucariotele superioare au fost descrise clasic baze pirimidinice și purinice metilate, ca metiladenina, mai frecvent 5-metil-citozina și chiar 5-hidroxi-metil-citozina (cap. III). Astfel de modificații ale ADN au fost descrise și la bacterii și la plasmidele bacteriene, la care, în plus, au fost puse în evidență și metilaze specifice. În procesul activării genice, metilarea ar fi o modificare capabilă să stabilizeze situri cognitive cu bisimetrie rotatorie și interactive cu complexele de transcriere ale ARN-polimerazei. Aceste situri ar facilita și replicarea mai rapidă a regiunilor transcriptive eucromatice. Deoarece metilazele bacteriene recunosc specific segmente de ADN, acest caracter s-ar putea extrapola și la metilazele de mamifere. Întrucît moleculele de PNH sînt foarte eterogene, nu este exclus ca în categoria lor să fie cuprinse și proteine enzimatice cu activități specifice privind diferite situri cognitive de la nivelul moleculelor de ADN.

5. *Structuri supraadăugate ale ADN raportate la stările de activare și inactivare genică. Unitatea de activare.* Studii cantitative asupra raporturilor dintre ADN heterocromatinic și ADN eucromatic din diferite tipuri celulare au demonstrat valori care indică totdeauna predominența primului. Deoarece s-a stabilit că porțiunile eucromatice sînt regiunile active în codificarea calitativă a proteinelor, s-a presupus că cea mai mare parte din ADN este consacrat organizării structurale a cromozomilor și programării din diferențiere. În conformitate cu această supoziție, ADN cromozomal este supraorganizat în două tipuri de structuri (Crick, 1971) : tipul globular cu segmente bicatenare suprapliate și condensate menținute de cantități mari de histone ; tipul fibros în care segmentele de ADN sînt liniare, fără replieri dense. Tipul globular ar corespunde zonelor heterocromatice care conțin și ADN repetitiv aglomerat, predomină cantitativ, iar tipul fibros corespunde eucromatinei și zonelor transcriptive. Prin raportare funcțională, se consideră că o unitate de activare genică este constituită fie dintr-o zonă globulară și un segment fibros, fie dintr-un segment fibros delimitat între două zone globulare (fig. 75). Ca la toate macromoleculele informaționale, unitatea funcțională în activa-

Scanned with OKEN Scanner

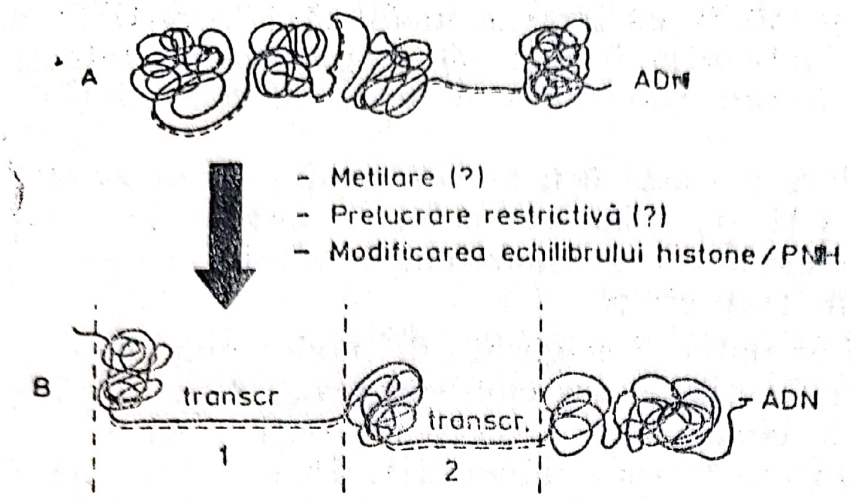


Fig. 75. Formarea unităților de activare (1, 2) cu ADN globular și fibros. Porțiunea transcriptibilă (transcr) este pregătită printr-o modificare a echilibrului histone/PNH, cît și posibil prin metilare (Riggs, 1975) și prin prelucrări restrînse cu specificitate segmentară.

rea genică ar fi formată din două părți: partea de organizare și control cantitativ mai mare; partea activității specifice cantitativ minoră. Prima parte are rolul de a asigura configurația optimă activității funcționale specifice care se desfășoară la nivelul celei de-a doua. Momentul activării genice ar consta din organizarea spațială a unei astfel de unități. În deciziile binare se impun totuși și inactivări paralele care să excludă din funcție o parte din regiunea transcrisă în celula parentală. Recondensarea părții active în structuri globulare prin conlucrarea dintre histone, factori de prelucrare ale ADN și PNH, ar putea constitui un model molecular al inactivărilor.

6. *Factorii de mediu intern angajați în amplificarea terminală a activării genice.* S-au descris numeroși factori, stimulatori preferențiali pentru creșterea diferitelor tipuri celulare gata diferențiate. Aceștia stimulează fie proliferarea tipului celular sensibil, fie amplificarea expresiei genice de proteine unice. Li se descriu fie o acțiune instructivă în sensul dirijării direcției de specializare a celulelor, fie o acțiune permisivă (de condiționare) în sensul că un tip celular, deși gata specializat, nu poate atinge cotele superioare necesare dezvoltării cantitative în absența factorului specific. În general, sînt numiți factori de creștere tisulară, li se dă o importanță deosebită în organogeneză și se presupune că fiecare organ are unul sau mai mulți factori de acest tip. Au fost descriși: factorul de creștere a nervilor, factorul de creștere epitelială, factorul mezenchimal pancreatic, eritropoetina, trombopoetina (stimulator al formării plachetelor sanguine), factorul de creștere a macrofagelor și granulocitelor, denumit și stimulator de colonii deoarece stimulează creșterea *in vitro* a celulelor pornind de la inoculări diluate. Acțiunea lor are loc prin intermediul sistemului cAMP influențînd atît replicarea ADN și diviziunile celulare, cît și reacțiile transferului de informație în expresia genică a proteinelor unice.

Scanned with OKEN Scanner

7. *Programarea temporală a diversificării la organismele eucariote, deşi evidentă, nu are un model molecular neechivoc.* Atît lucrările clasice, cît şi cele recente referitoare la eucariotele inferioare, ca levurile *(Sacharomyces cerevisiae)*, alţi fungi inferiori, ca *Dictyostelium discoideum*, au demonstrat o succesiune temporală stabilă a ciclului de dezvoltare format din comutări caracteristice în sintezele de enzime, în degradarea acestora, în transcrierea ordonată în etape funcţionale a diferitelor porţiuni din ADN (Halvorson, 1977; Ashworth, 1977). Dar succesiunea temporală ordonată a ciclului de viaţă a fost de mult observată, din perioada clasică a studiilor morfologice privind embriogeneza la eucariotele superioare. Majoritatea studiilor moleculare moderne urmăresc comutările cantitative de enzime, măsura în care un grup de enzime caracteristic unei etape este înlocuit cu alt grup de enzime caracteristic etapei care urmează. Se constată aceste modificări şi se interpretează ipotetic pe bază de modele dominate de mecanismele care includ acţiunea factorilor inductori exocelulari fie de mediu intern, fie de mediu extern cărora li se atribuie mari capacităţi de „instruire" a celulelor pentru direcţia de specializare. Conceperea de modele pentru dezvoltarea ciclică a eucariotelor se sprijină majoritar pe extrapolarea datelor de la procariote şi în particular de la bacterii şi bacteriofagi. La bacterii şi bacteriofagi există însă numai rudimente fie de modificări adaptative celulare (sporogeneza şi germinarea) mai puţin conectate diferenţierii, fie de diversificare binară a bacteriofagilor temperaţi în direcţia ciclului litic sau în ciclul lizogen, mai analoagă diferenţierii.

a) *Programarea deciziei asupra ciclului evolutiv la fagul* λ. Bacteriofagul λ este un colifag de mărime medie al cărui cap conţine cromozomul fagic, format dintr-o moleculă liniară de ADN de $30{,}8 \times 10^6$ daltoni, ceea ce corespunde la 46 500 perechi nucleotidice (Davidson şi Szybalski, 1971). După injecţie în celula gazdă molecula de ADN fagic se circularizează datorită extremităţilor adezive monocatenare formate din 12 dezoxinucleotide complementare. Imediat circularizarea se stabilizează prin legarea covalentă a celor două extremităţi, sub acţiunea ligazei, de gazdă. Decizia privind evoluţia litică sau lizogenă depinde de felul tulpinii fagice şi de condiţiile fiziologice ale gazdei. Evoluţia litică este caracterizată prin exprimarea secvenţială a funcţiilor pentru replicarea ADN, sinteza proteinelor capului şi cozii, formarea de noi particule mature care culminează cu moartea şi liza celulei gazdă. În decizia pentru lizogenie genomul circular este reliniarizat simultan cu inserţia acestuia în cromozomul celulei gazdă. Aceasta se datorează unei enzime Int (integrază) codificată de genomul fagic, mediatoare a procesului de inserţie şi se mai datorează sintezei represorului de fag codificat de gena *cI* care blochează toate funcţiile litice (fig. 76). Decizia de lizogenie şi rămînerea în starea de lizogenie au loc dacă represorul este produs înainte ca dezvoltarea expresiei

Scanned with OKEN Scanner

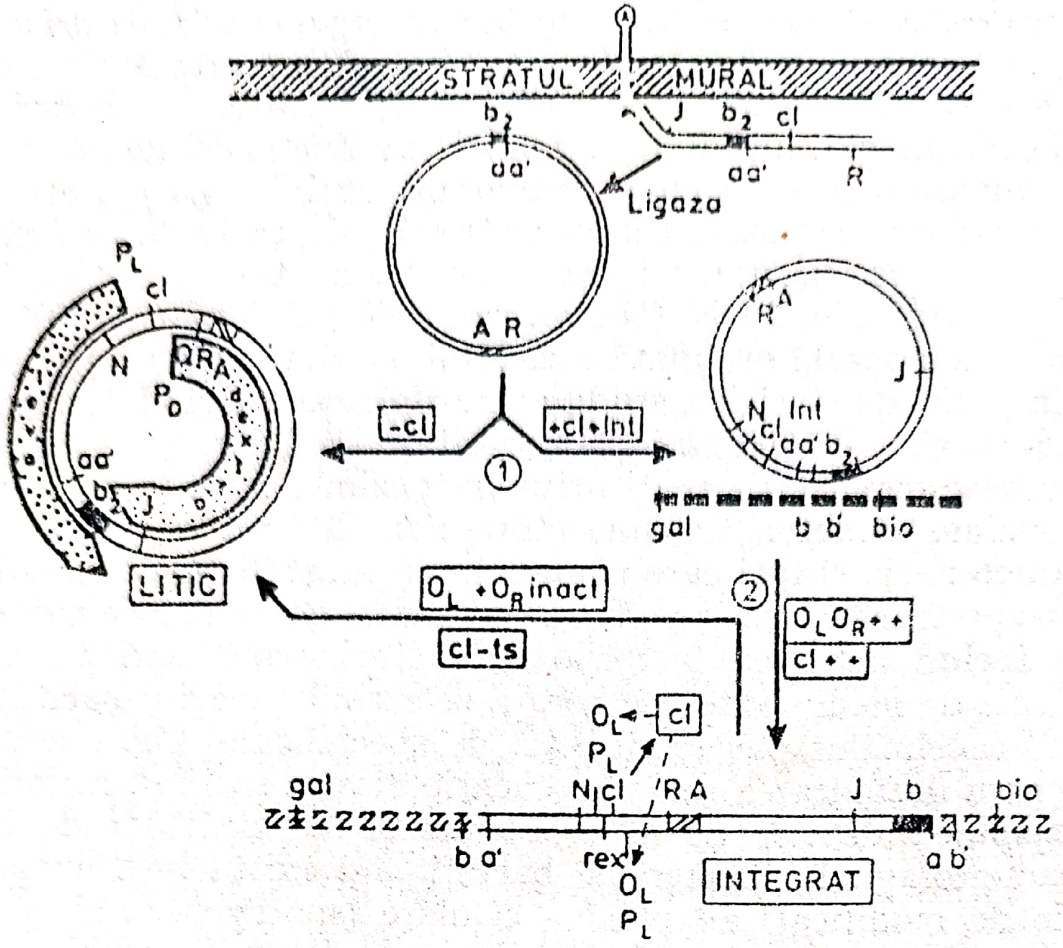


Fig. 76. **Deciziile binare din ciclul evolutiv al fagului λ, după infecția celulei gazdă.** 1 = Decizia binară fie spre ciclul litic, fie spre starea de profag. 2 = Decizia binară din starea de profag fie spre propagare odată cu cromozomul bacterian și sub controlul acestuia, fie spre ciclul litic. Transcrierea genomului de λ în ciclul litic are loc în două direcții pe catene diferite ale ADN bicatenar, dar nu în regiuni suprapuse: catena L are levotranscriere; catena R (engl. *r*ight) are dextrotranscriere. *cI* = gena represor, *Int* = gena de integrază, Int = integraza (complex enzimatic de recombinare), O_L = operator pentru levotranscriere lincat de promotorul P_L. O_R = operatorul de dextrotranscriere lincat de promotorul P_R. *A*, *J*, *N*, *Q* și *R* sînt gene codificatoare ale proteinelor capului, cozii și respectiv ale unor proteine reglatoare.

genice a funcțiilor litice să înceapă. În starea lizogenă (de profag) în care genomul fagic este integrat liniar în cromozomul celulei gazdă, profagul este moștenit de toate bacteriile progene ca o regiune genetică oarecare și transmiterea lui se termină odată cu moartea bacteriilor. Supraviețuirea profagului necesită o nouă decizie, aceea de a scăpa din integrarea genomică bacteriană și de a intra în expresia genică a ciclului litic. Aceasta are loc în cadrul inducției în care primul pas constă din anularea interacțiunii dintre represor și operatorii de transcriere.

Starea de profag este menținută prin transcrierea a aproximativ 4% din întregul progenom fagic, procent reprezentat de gena *cI* care codifică represorul și gena *rex*, codificatoare a unui produs de oarecare importanță pentru propagarea stabilă a profagului și care, tot-

Scanned with OKEN Scanner

odată, conferă în decizia de inducție o reproducere mai rapidă față de eventualele genoame nelizogene (Szybalski, 1977). Cele două componente și în particular represorul interacționează cu doi operatori O_L și O_R (engl. *operator left* și *operator right*), blocînd transcrierile bidirecționale caracteristice fagului λ (levotranscriere și dextrotranscriere) (fig. 76). Decizia spre inducție apare natural destul de rar, cu frecvența mutațiilor și are ca mecanism alterarea replicativă a ADN din segmentele O_L și O_R făcîndu-le conformațional inapte de a mai interacționa cu represorul cI, ceea ce are ca rezultat declanșarea proceselor de dezvoltare litică. Frecvența inducției poate fi crescută artificial prin interferența tranzitorie a sintezei ADN bacterian cu ajutorul iradierii, analogilor de baze azotate, mitomicinei, streptonigrinei care cresc frecvența de alterare a ADN. Acesta dobîndește o stare de slabă afinitate pentru represor în regiunile O_L și O_R. Experimental s-au obținut mutații în gena *cI* producătoare de represori activi la 37°, dar inactivi la 41° (represori termosensibili-*ts*). Incubarea la 41° a bacteriilor cu profag λ posesor al mutației cI-ts inactivează represorul și inducția se produce. Inducția este evenimentul declanșator al unei rețele complicate de factori care reprezintă diferențierea terminală și formarea virionilor maturi. În alte sisteme de decizie pentru integrare sau inducție sînt descrise mecanisme diferite. De exemplu, pentru menținerea stării integrate, represorul specific de blocare a transcrierii este codificat de gene reglatoare ale celulei gazdă. În alte cazuri, situl de atașare este situat între genele codificatoare ale ciclului litic și promotorul acestora în așa fel că evenimentul de integrare le disociază și face imposibilă inițierea transcrierii. Oricum, deciziile binare ale fagilor capabili de integrare, fie spre ciclul litic, fie spre cel lizogen, ca și integrările plasmidelor organizatoare de transfer interbacterian, sînt procese stabile asemănătoare diferențierii la eucariote. În afara condițiilor de decizii binare ale plasmidelor cu capacitate integrantă (cap. XIII) și fagilor lizogeni, celelalte schimbări adaptative ale procariotelor (sporogeneza, germinarea) par a avea mai puține conexiuni cu diferențierea de la majoritatea eucariotelor multicelulare.

b) *Posibilitatea extrapolării la organismele eucariote.* La eucariotele inferioare monocelulare cu stadii orare de agregare, ca *Dictyostelium discoideum*, un control transcriptiv de tip procariotic poate fi luat în considerație, datorită simplității genomice. La eucariotele superioare complexitatea genomică și diversificarea celulară omniprezentă nu permit extrapolarea datelor de la procariote pentru explicarea declanșărilor multiple într-o perioadă ontogenică progresiv mai de durată, cu cît organismul este situat mai sus în arborele evolutiv. Rețeaua de evenimente și factori participanți în diversificare este aparent foarte vastă și se cunosc puține date. Acestea privesc mai ales organogeneza terminală, stadiu care nu constituie diferențierea de origine. Cele două

Scanned with OKEN Scanner

modele ale diversificării celulare fie prin multipotența inițială și inducții exocelulare, fie prin decizii binare endocelulare în cicluri cantificatoare nu au o bază experimentală lipsită de ambiguități. Totuși modelul aliniamentelor timpurii cu decizii binare endocelulare pare mai potrivit concepției moderne privind codificarea caracterelor prin transfer informațional și a dependenței inițiale a oricărui caracter de preexistența unei regiuni genomice care să-i corespundă. Considerarea mediului intern ca declanșator al diversificării celulare pare o orientare de tip adaptaționist, extinsă de la concepția adaptării preclasice în explicarea originii speciilor și filogenezei, la explicarea ontogenezei celulare. Și concepția adaptării preclasice atribuie multipotența de variație unui organism a cărui evoluție filogenetică de speciație se produce prin adaptare la mediul extern ca inductor de variații care se transmit apoi ereditar, neimplicînd importanța construcției genomice. Modelul deciziei binare în cicluri celulare de cantificare și segregare timpurie de aliniamente, formulat de Holtzer și Rubinstein (1977), pare mai potrivit în interpretarea unor demonstrații experimentale și observații biologice generale. De exemplu, dezvoltarea celulei ou la *Drosophila* are loc printr-un fenomen asemănător endomitozei. Nucleul inițial se divide de aproximativ 11 ori în timp de două ore fără să fie însoțit de plasmadiereză. Nucleele formate se distribuie apoi spre periferia citoplasmei și formează o celulă multinucleată denumită preblastoderm (Scheiderman și Bryant, 1971). Observîndu-se că secțiuni din preblastoderm pot fi transplantate în abdomenul adulților unde se diferențiază și dezvoltă organe mature, s-a stabilit că jumătățile obținute prin secționarea blastodermului dezvoltă organe diferite; dintr-o jumătate se dezvoltă organele craniale, din cealaltă se diferențiază organele genitale. Această observație sugerează că deciziile de diversificare sînt „consemnate" de timpuriu în genomii celulari, întrucît este greu de imaginat ca o citoplasmă unică să fie divizată în micromedii diferite cu inductori (evocatorii, determinanți) exonucleari specializați. Oricum, cercetările guvernate de modelul celulelor multipotente și al inductorilor exocelulari evocatori sau determinanți nu au lămurit problema diferențierii, deși eforturile călăuzite de acest model au fost și sînt considerabile.

*

În concluzie, expresia genică rezultă dintr-un ansamblu de interacțiuni desfășurat la un nivel superior de diferențiere, programare și adaptare la condițiile ecologice. Aceste procese complexe sînt asigurate de regiuni genetice specializate care constituie porțiuni mari din genom, cantitativ mai mari decît cele rezervate genelor structurale și de prelucrare. Genele de programare și diversificare sînt puțin cunoscute iar importanța lor este reliefată mai pregnant în noul model de diversificare prin decizii binare și segregare de aliniamente. Cartarea acestor

Scanned with OKEN Scanner

decizii poate fi efectuată prin studiul compartimental celular dus pînă la nivelul cunoașterii programative a fiecărei celule luate singular. Complexitatea expresiei genice a proteinelor mature (vezi capitolul precedent), mecanismele implicate de reglarea cantitativă de tip adaptativ, cît și procesele diferențierii necesare producției specifice în compartimente tisulare specializate indică participarea multigenică în expresia finisată a oricărei proteine.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul XI

MUTAȚIILE ȘI RECOMBINĂRILE, MECANISME MOLECULARE ÎNTREPĂTRUNSE ALE VARIABILITĂȚII

În conformitate cu fidelitatea replicării ADN ca mecanism bazal al păstrării informației genetice, genele ar putea fi considerate ca unități funcționale dotate cu capacitatea de a conserva rigid complexul de caractere codificat în transferul informațional ADN→ARN→proteină. Dacă moleculele păstrătoare de informație s-ar fi comportat rigid, ar fi avut loc o stagnare încă din etapele primordiale ale biogenezei, iar lumea vie cuprinsă în biosferă nu ar mai exista. Dar macromoleculele informaționale, de la formele primitive probabil simple pînă la diversitatea complexă a viețuitoarelor, au manifestat și plasticitate, vitală pentru existența materiei vii, furnizată de mecanismele mutației și recombinării. Aceste mecanisme constituie baza variabilității. Deși mutația și recombinarea sînt privite ca două mecanisme separate, întrepătrunderea lor într-un proces unitar este evidentă chiar din datele clasice iar datele mai recente subliniază pregnant unitatea lor.

1. Date clasice care indică întrepătrunderea fenomenelor de mutație și recombinare. După criteriul nivelului genomic al modificărilor, mutațiile se împart în patru tipuri: 1) mutații genomice (schimbări în numărul de cromozomi; 2) mutații cromozomale (schimbări microscopic vizibile) în structura cromozomilor; 3) mutații genice și 4) mutații punctiforme care constau din modificări nedetectabile prin microscopia cromozomilor, deoarece interesează mărimea unei gene sau fragmente de genă pînă la o pereche nucleotidică. Luînd în considerație același criteriu, recombinările se împart tot în patru tipuri: 1) recombinări genomice în care unitățile de schimbare sînt cromozomi întregi; 2) recombinări cromozomice cu schimbări de fragmente cromozomice vizibile microscopic; 3) recombinări genice și 4) recombinări punctiforme nedetectabile prin microscopie, deoarece schimbările interesează o genă sau fragmente de genă pînă la mărimea unui nucleotid. Asemănarea evidentă dintre clasificări conduce la dificultăți remarcabile în a aprecia originea unei schimbări naturale și la caracterizarea ei. De exemplu, anomaliile cromozomice de structură sînt

Scanned with OKEN Scanner

mutații cromozomice sau recombinări? Anomaliile de număr sînt mutații genomice sau recombinări genomice? Oricum ar fi considerate respectivele schimbări, nici una dintre ipostaze nu poate fi greșită, mai ales cînd noțiunile sînt raportate la schimbări naturale (spontane) ale căror evenimente apriorice nu sînt cunoscute. Întrepătrunderea celor două mecanisme rezultă și din datele clasice privind efectele agenților mutageni asupra frecvenței de recombinare. La bacterii s-a observat că radiațiile UV cresc frecvența de recombinare (Jacob și Wollman, 1955) iar la eucariote mitomicina C induce o creștere a recombinărilor mitotice (Holliday, 1964). Astfel de efecte comune agenților mutageni ar îndreptăți desemnarea lor ca agenți recombinogeni și implică ambiguitatea originii mutaționale sau recombinaționale a schimbărilor induse la nivelul celulelor cu mai mulți cromozomi și la organismele sexuate care prin ontogeneza lor sînt obligatoriu recombinanți. Totuși diferența majoră dintre mutație și recombinare constă în condiția esențială a recombinării: pe cînd evenimentele de recombinare se dezvoltă numai cînd doi genomi cu omologii structurale sau fragmente derivate din ei se găsesc în aceeași citoplasmă, mutațiile se produc independent de această condiție. Ca un corolar imediat, recombinarea presupune un aparat sau mecanism aprioric de captare într-o celulă acceptoare a materialului genetic aparținînd altei celule. Mutațiile nu necesită un astfel de aparat sau mecanism. Aceste trăsături comune ale mutației și recombinării stabilite în etapele clasice premoleculare și moleculare sugerează similitudini care devin evidente prin aprofundarea bazei moleculare.

2. **Mecanismele moleculare ale mutației.** Deoarece prin mutație înțelegem modificarea informației genetice păstrate în genom sub forma secvențelor de baze din ADN, atunci schimbarea mutațională are ca substrat modificări ale secvențelor de baze. Mutațiile la nivele de mare anvergură care au ca substrat modificări ale numărului de cromozomi sau mari schimbări microscopic vizibile în structura cromozomilor se explică prin perturbări ale întregii informații genetice raportate la totalul genomului. Acestea sînt furnizate de prejudicii cantitative și de supraorganizare a ADN fără a viza schimbări de structură moleculară bazală. Mutațiile genice sau infragenice în majoritate nu produc schimbări cantitative semnificative ale ADN, adesea genele nu-și modifică poziția din cromozom, ci numai calitatea funcțională. Astfel de mutații (care generează alele) nu pot fi explicate numai prin schimbări cantitative ale materialului genetic, ci prin schimbarea secvenței de baze și implicit a informației genetice. În conformitate cu clasicismul molecular, tipurile de schimbări sînt: a) tranziția — în care cele două perechi posibile de baze AT și GC se înlocuiesc reciproc, AT $\rightleftharpoons$ GC, respectînd regula ca în aceeași catenă baza purinică să fie înlocuită tot cu o bază purinică iar baza pirimidinică tot cu o

Scanned with OKEN Scanner

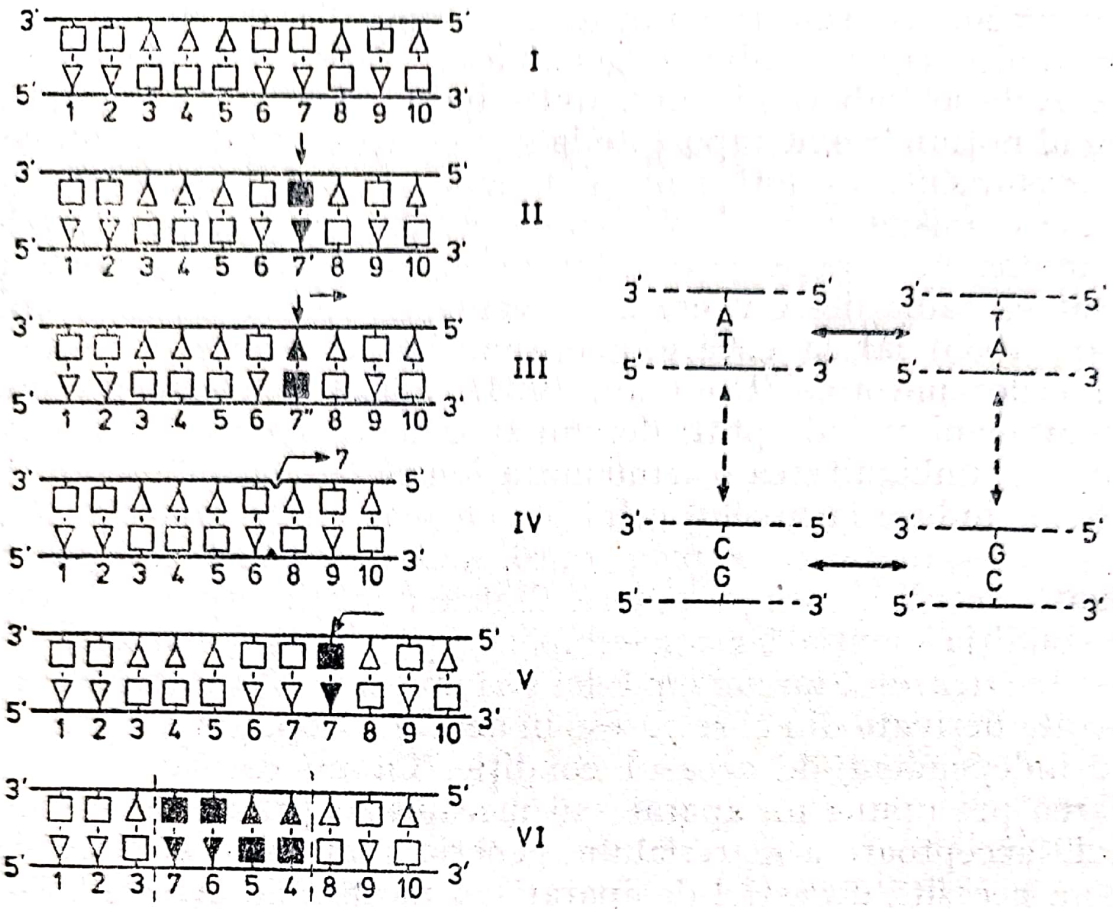


Fig. 77. Ilustrarea tipurilor de schimbări în secvenţa dezoxiribonucleotidică din ADN inspirată din descrierea clasică a lui Freese (1963). Triunghiurile sînt baze pirimidinice, iar pătratele sînt baze purinice. Cifrele 1, 2, 3, ...10 sînt perechile de baze. I Segmentul ADN original de referinţă pentru tipurile de schimbări. II—Tranziţia. III—Transversia. IV—Deleţia. V—Inserţia. VI—Inversia. În dreapta se redau tipurile de transversii posibile: săgeţile continue — transversii homoloage, săgeţile întrerupte-transversii heteroloage, adică AT→TA şi invers, respectiv TA→GC şi invers.

bază pirimidinică; b) transversia care constă tot dintr-o înlocuire reciprocă a celor două perechi posibile, dar în acest caz baza purinică dintr-o catenă este înlocuită cu o bază pirimidinică iar baza pirimidinică de o bază purinică (fig. 77); c) deleţia înseamnă excluderea de perechi bazice din structura ADN, deleţia minimă fiind suprimarea unei singure perechi; d) inserţia înseamnă adăugarea în plus a cel puţin unei perechi de baze; e) inversia semnifică rotirea unui segment de cel puţin două baze, cu 180°, în aşa fel că ordinea bazelor din segment devine inversată. Tipurile de schimbări au fost teoretic deduse din alterările fizico-chimice provocate de agenţii mutageni: schimbarea stărilor tautomere (fig. 78) şi ionizarea bazelor; dezaminări oxidative care duc la formarea de derivaţi neobişnuiţi în ADN de tipul xantinei, uracilului, hipoxantinei; încorporarea de analogi ai bazelor dintre care cel mai mult utilizaţi sînt 5-bromo-uracilul sub forma de 5 bromodezoxiuridină (5-BUdR-5-bromouracil dezoxiribotid) şi 2-aminopurina; excluderea de baze prin depurinizare şi depirimidinare;

Scanned with OKEN Scanner

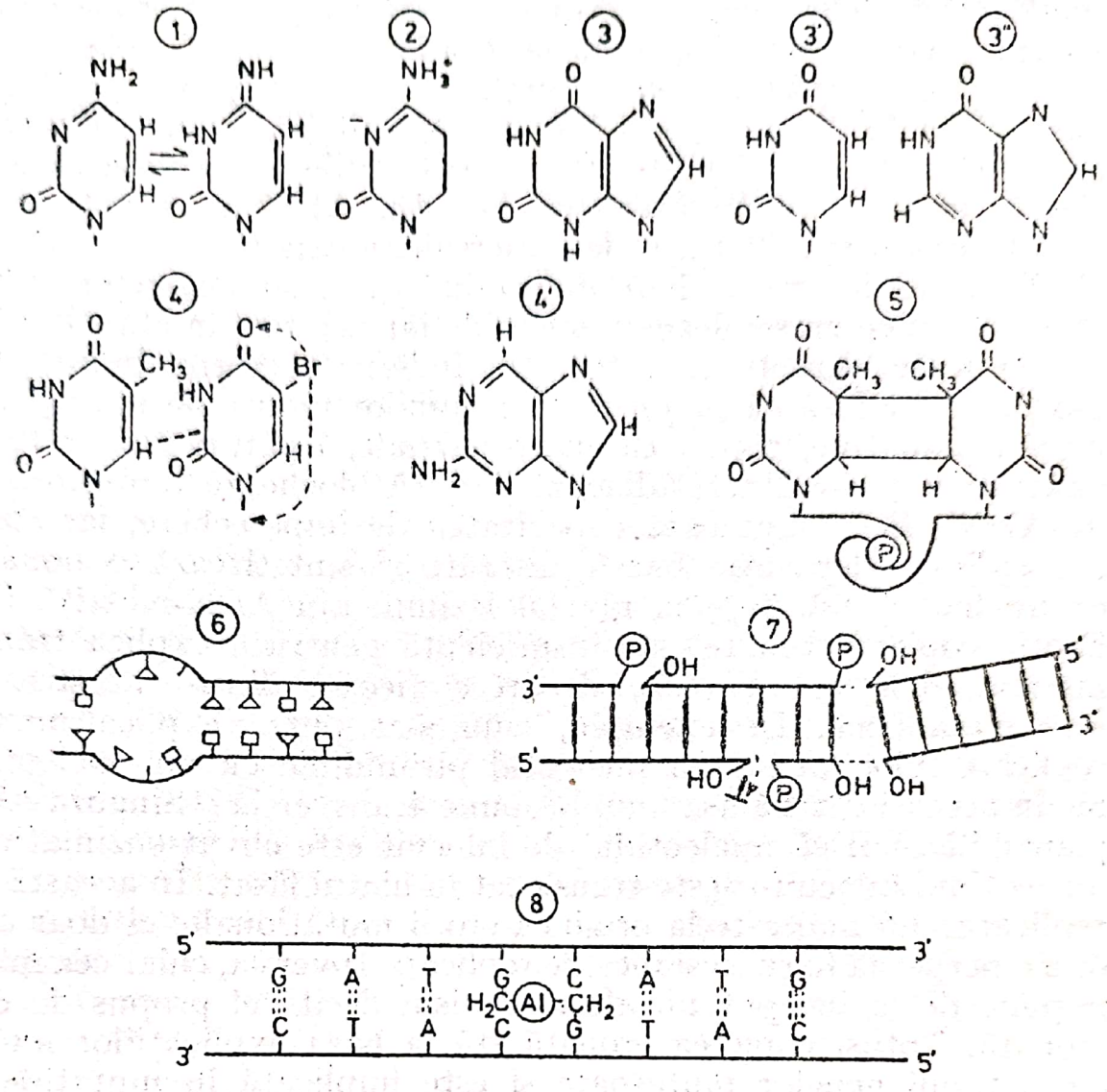


Fig. 78. Leziuni ale moleculelor de ADN interesînd fie bazele, fie lanţurile glucidofosforice. 1 = Tautomerizarea C din forma amină în forma imină necomună şi capabilă să se împerecheze eronat cu A. 2 = Ionizarea C care inhibă replicarea şi favorizează ruperi catenare. 3 = xantina, produs de dezaminare a G incapabilă de împerecheri. 3′ = uracil produs de dezaminare a C şi 3″ = hipoxantina rezultată din dezaminarea A. 4 = 5-Bromo-uracil, analog al timinei capabil de împerecheri greşite frecvente. 4′ = 2-Amino-purina analog purinic inductor de împerecheri greşite şi blocator al sintezei de ADN. 5 = Dimer timinic indus de UV; două T adiacente se leagă între ele alcătuind o structură ciclobutan dipirimidinică stabilă care distorsionează legătura fosfodiesterică. 6 = Depurinizări şi depirimidinări. 7 = Ruperi ale catenei glucidofosforice: ruperi monocatenare cu pierderi nucleotidice (crestări şi hiaturi); ruperi bicatenare prin desfacerea legăturilor fosfodiesterice opozante. 8 = Legarea transversă printr-un agent alchilant Al care constituie o punte covalentă între două G situate pe catene opuse, însă steric învecinate.

fragmentarea catenelor de ADN prin ruperea legăturii fosfodiesterice; legarea transversă a catenelor; dimerizarea pirimidinelor adiacente (fig. 78). Explicarea mecanismului prin care leziunile din ADN induc cele cinci tipuri de schimbări în secvenţa de baze este furnizată de

Scanned with OKEN Scanner

două teorii : teoria copierii eronate ; teoria reparării eronate printr-un sistem factorial predispozant la erori.

1. *Teoria copierii eronate* (engl. *miscopying theory) și limitele sale.* Formulată de Watson și Crick în etapa corifeică a geneticii moleculare, ea a dominat solitară peste 10 ani explicațiile moleculare ale mutației. Teoria afirmă că alterările bazelor din ADN au drept consecință modificări ale specificității de împerechere care induc erori de copiere. Modificările de împerechere determină ca în sinteza replicativă ADN să se specifice greșit dezoxinucleotide iar acestea, în etapele ulterioare de replicare perpetuează, teoretic indefinit, erorile induse lezional. S-a observat însă că majoritatea leziunilor induse de mutageni (dezaminări oxidative, ruperi catenare parțiale, legături transverse, dimerizări între pirimidinele adiacente) fie că blochează replicarea (sinteza de ADN), fie că anulează capacitatea de împerechere, iar complexul de replicare depășește bazele alterate și sintetizează o nouă catenă cu un hiat (engl. *gap*) la nivelul leziunii din ADN-matriță (fig. 79). Teoria copierii eronate este insuficientă pentru a explica transversia, inserția, deleția, inversia, deoarece fiecare dintre acestea implică alte mecanisme. De exemplu, cum s-ar putea explica numai prin replicare înlocuirea unui nucleotid pirimidinic cu un nucleotid purinic în aceeași catenă așa cum propune transversia ? Singura explicație plauzibilă ar fi că nucleotidul de înlocuit este clivat enzimatic și apoi nucleotidul înlocuitor este translocat în hiatul lăsat. În această situație replicarea nu mai este la originea erorii mutaționale, ci doar are rolul de a o perpetua în succesiunea de replicări. Inversia, chiar cea minimală, impune de la început un alt mecanism decît cel propus de copierea eronată. Totuși copierea eronată stă la baza explicațiilor moleculare ale acțiunii genelor mutatoare și este implicată în mutațiile induse de analogi bazici sau de tranzițiile tautomere. Ea poate avea importanță în apariția mutațiilor spontane.

2. *Teoria reparării eronate prin acțiunea unui sistem factorial inductibil predispus la erori sau sistem SOS.* Majoritatea leziunilor ADN provocate de agenții mutageni sînt prejudicii profunde care constau din desfacere de legături covalente sau formarea de noi legături. O parte sînt incompatibile cu replicarea și transcrierea. S-a observat însă că un număr mare din leziunile moleculare induse de

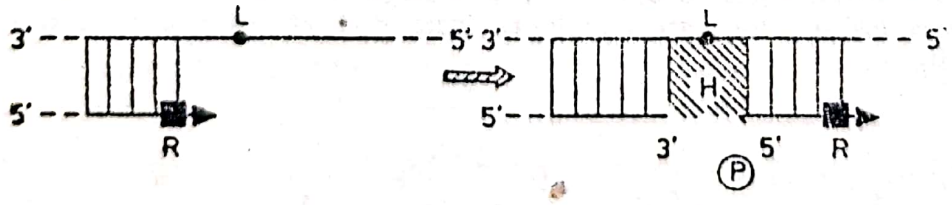


Fig. 79. Replicarea poate depăși o leziune mutagenă monocatenară în dreptul căreia lasă un hiat (engl. = *gap*) în catena nou formată. L = leziune. R = agregatul de replicare. H = hiat monocatenar în structura bicatenară.

Scanned with OKEN Scanner

mutageni, după un timp variabil, sînt eliminate prin procese de reparare la care participă sisteme de enzime reparatoare. Procesele de reparare au fost descrise întîi la bacterii, apoi și la eucariote într-un număr considerabil de studii, printre care se remarcă cele efectuate de Howard-Flanders (1966, 1968), Witkin (1969, 1973), Setlow (1968), Hanawalt și col., (1968), Kondo (1974), Caillet-Fauquet și colab. (1977) și alții. La modul general, repararea leziunilor ADN constă dintr-o succesiune de reacții biochimice analogică unei căi metabolice oarecare (fig. 80 și fig. 81). Procesele de reparare sînt variabile în mai multe privințe : timpul de realizare, condiții energetice, enzimele și factorii implicați, raporturile cu momentul replicării la nivelul leziunii în reparare, competitivitatea leziunii de reparat cu replicarea. Din aceste trăsături generale rezultă că reparările sînt în concurență temporală cu sinteza replicativă a ADN și sînt fiziologic necesare pentru a permite sinteza ADN, reacție vitală pentru dezvoltarea și proliferarea celulară. Astfel, reparările pot fi împărțite în sisteme diferite : sisteme de reparare simple constitutive cu desfășurare rapidă ; sisteme de reparare constitutive complexe ; sisteme de reparare inductibile care se desfășoară mai tardiv : 1) Sistemele de reparare simpie repară rapid leziunile ADN și replicarea nu surprinde porțiunea lezată nereparată (fig. 80) ; 2) Sistemele reparatoare constitutive complexe au mai multe etape de desfășurare, necesită timp mai îndelungat de îndeplinire și pot fi surprinse de momentul replicării în următoarele situații : a) leziunea nu-i reparată sau este într-un moment al reparării care nu permite realizarea replicării ; b) repararea este incompletă, dar stadiul în care se află permite agregatului de replicare să depășească

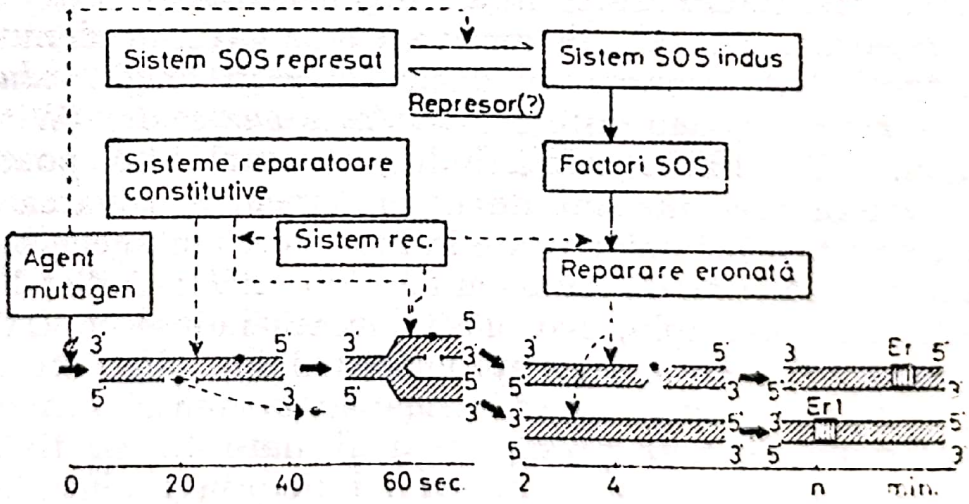


Fig. 80. Tipuri de sisteme de reparare și raporturile lor temporale în raport cu replicarea. Sistemul inductibil de reparare predispus la erori, denumit și sistem SOS, acționează mai tardiv și adesea asupra unui ADN replicat cu leziuni mai mari amplificate de replicare. Sistem rec. = sistemul factorilor de recombinare care conlucrează cu sistemele constitutive și inductibile. Er = erori de reparare la nivelul leziunii. Erl = schimbare eronată și în molecula indemnă, provocată de sistemul SOS.

Scanned with OKEN Scanner

segmentul incomplet reparat lăsînd un hiat de neîncorporare în catena născîndă; c) repararea este realizată în timp util şi punctul de replicare trece normal pe la nivelul fostei leziuni, ca şi cum nimic nu s-ar fi întîmplat ; 3) Sistemul de reparare inductibil este mai tardiv datorită etapelor inductibile necesare producerii factorilor de reparare fiind corelat cu interschimburi de segmente, acţionează în general postreplicativ şi repară leziunile pe care primele sisteme nu au fost capabile să le rezolve înaintea replicării. Sistemul inductibil de reparare se exprimă printr-un mecanism comparabil cu un circuit de reglare negativă de tip operonic (fig. 80) şi repară tardiv hiaturile catenare şi resturile lezionale pe care celelalte sisteme reparatorii le-au părăsit fiind depăşite de viteza replicării. Acest sistem solicită şi factori comuni recombinării, iar reparările realizate de factorii lui nu mai sînt fidele secvenţelor de baze din ADN predecesor. Lipsa de fidelitate se datorează fie configuraţiei leziunilor părăsite de primele sisteme, fie fidelităţii informaţionale mai puţin marcate a factorilor care-l alcătuiesc. Sistemului inductibil i se atribuie un caracter de ajutor urgent pentru supravieţuire, deoarece leziunile rămase prejudiciază sau exclud posibilitatea unei noi replicări. Unele leziuni, ca dimerii pirimidinici induşi de iradierea UV, permit trecerea agregatului de replicare fără însă a fi capabile de a specifica încorporări în catena născîndă în care lasă un gol anucleotidic corespunzător. Aceste hiaturi sînt în parte reparate postreplicativ, fie prin recombinări între moleculele surori rezultate din replicare, fie prin sistemul inductibil. Trăsăturile sistemului inductibil îi atribuie sugestiv capacitatea de a induce erori în secvenţa nucleotidică păstrătoare de informaţie şi calitatea de a fi mecanismul de ajutor urgent, solicitat vital pentru replicările ulterioare esenţiale organismului purtător de leziuni ADN nereparate. Din aceste motive i s-au atribuit denumirile de sistem inductibil de reparare predispus la erori (engl. *inducible error-prone repair system*) sau sistem SOS *(save our souls)* (Witkin, 1973; Radman, 1974, 1977). Odată indus, sistemul SOS poate repara eronat şi leziuni care nu sînt de urgenţă pentru salvarea replicării (adică nu sînt SOS) şi chiar poate induce erori mutagene în regiuni care nu sînt prejudiciate de mutagen (Witkin, 1973; Caillet-Fauquet şi colab., 1977). De exemplu, s-au găsit mutaţii induse cu UV la nivelul unor gene care nu au în secvenţa lor pirimidine adiacente şi unde iradierea UV nu a putut provoca formarea de dimeri pirimidinici. Inducţia sistemului SOS se presupune a fi datorită inactivării unui represor SOS fie prin acţiunea mutagenului, fie prin produşii lezionali din ADN eliberaţi parţial de sistemele reparatoare constitutive (fig. 80). O caracteristică de bază a sistemului SOS constă în faptul că este tranzitoriu, starea indusă persistă atît timp cît există agenţi inductori, apoi activitatea lui este represată. Starea tranzitorie este fiziologic importantă, deoarece persistenţa lui constitutivă ar duce la un nivel

Scanned with OKEN Scanner

de mutabilitate incompatibil cu nivelele de frecvență mutațională cunoscute și cu supraviețuirea. În concluzie, teoria reparării eronate presupune un sistem de reparare predispus la erori care acționează după replicarea postlezională mutagenă, este inductibil, tranzitoriu și ancorat în angrenajul de factori ai recombinării.

3. *Dimerii induși de radiațiile UV, repararea lor și cîteva date experimentale care argumentează teoria sistemului SOS.* Utilizarea largă a radiațiilor UV ca mijloc de aseptizare în laboratoarele de cercetare și în alte împrejurări, sensibilitatea specifică a acizilor nucleici la UV, cît și mînuirea facilă au dus în ansamblu la utilizarea lor preferențială ca agent mutagen. Leziunile ADN provocate de UV sînt cunoscute din etapa clasică a cercetărilor moleculare. Dintre aceste leziuni, cele mai frecvente sînt dimerizările pirimidinelor adiacente sub forma de ciclobutani dipirimidinici (fig. 78). Astfel de dimeri pot apărea între toate pirimidinele. Din totalul dimerilor, 50% sînt T = T, 40% T = C și 10% C = C, valori din care rezultă că T este cea mai predispusă dimerizării. Dimerii sînt fotoprodușii stabili și pot fi obținuți în stare pură prin hidroliza ADN expus la ultraviolete. Pot fi obținuți și din ADN extras din celule tratate cu UV.

Observații mai vechi au demonstrat că efectul bactericid al UV este mult diminuat dacă bacteriile tratate cu UV sînt expuse imediat la o sursă puternică de lumină vizibilă, fenomen denumit din acest motiv fotoreactivare. Fotoreactivarea a fost demonstrată ca proprietate generală a bacteriilor, descoperindu-se a fi prezentă și la eucariote. Fenomenul fotoreactivării este un mecanism rapid de reparare prin care dimerii aflați în ADN sînt desfăcuți în resturile pirimidinice inițiale fără desprinderea lor din structura macromoleculară. Procesul este catalizat de o enzimă constitutivă (se află gata sintetizată în orice celulă producătoare), inactivă la întuneric și activată de lumina vizibilă, motiv pentru care a fost numită enzimă fotoreactivantă. Reacția de fotoreactivare are o singură etapă și constă din ruperea celor două legături ciclobutanice dintre pirimidine și restabilirea dublelor legături dintre carbonii 4 și 5. Rapiditatea cu care decurge și restaurarea completă a structurii ADN determină ca mecanismul reparării prin fotoreactivare să fie de mare fidelitate iar recuperarea celulelor să fie de un nivel foarte ridicat. Simplitatea și specificitatea reacției o fac improbabilă să comită erori generatoare de mutații. Fotoreactivarea constituie cel mai simplu sistem de reparare a leziunilor ADN, cel mai rapid, singurul care necesită lumina vizibilă și are probabilitatea cea mai mică de a fi surprins de replicare. Este și unicul sistem de reparare care necesită o singură etapă. Sistemul de reparare fotoreactivantă răspîndit la animale și plante s-a dovedit a nu fi prezent la mamiferele placentare și implicit la om (deși a fost observat la marsupiale) (Painter, 1974).

Scanned with OKEN Scanner

Un alt sistem de reparare a leziunii dimerice UV își desfășoară activitatea fără intervenția luminii și se bazează pe un mecanism complex de mai multe etape, este tot constitutiv și are ca rezultat excizia dimerilor din constituția ADN lezat și repararea hiatului rămas ca urmare a exciziei. Procesul de reparare prin acest sistem este o cale metabolică endergonică rezumată prin reacția:

$$\text{ADN cu dimeri} \xrightarrow[+\ \text{dNTP}(+\ \text{energie})]{\text{enzime reparatoare}} \text{ADN adimeric} + \text{dimeri.}$$

Existența sistemului reparator constitutiv de excizie-reparare a fost demonstrată de următoarele constatări experimentale; 1) celulele iradiate cu UV au capacitatea să se reactiveze și la întuneric dacă se lasă un timp suficient de lung de incubație; 2) între tulpini bacteriene ale aceleiași specii și între specii sînt diferențe mari în capacitatea de reactivare, ceea ce conferă o mare diversitate în rezistența la UV și sugerează un mecanism reparator constitutiv care prezintă variații genetic determinate; 3) mutanții deficitari în fotoreactivază au totuși capacitatea de reactivare la întuneric; 4) reactivarea la întuneric este însoțită de eliberarea în citosol a dimerilor pirimidinici; 5) s-au descoperit mutanți biochimici diferiți incapabili de reactivare la întuneric, dintre care unii erau incapabili să elibereze dimeri din macromoleculă, unii eliberau dimeri, dar nu-și puteau repara ADN adimeric mai departe, unii aveau ADN crestat la nivelul dimerilor, dar acesta persista să-i păstreze sub forma unei monocatene care proemina în afara structurii bicatenare, iar alții nu-și puteau repara o crestătură ADN, deși elimina dimeri din ADN.

Studiile biochimice ale acestor mutanți denumiți și *uvr*$^-$ (deficitari în repararea leziunilor UV) au demonstrat că la fiecare din aceștia sînt absente activități enzimatice legate de procesul de reparare, enumerate în continuare în ordinea deficiențelor: absența unei endonucleaze specifice pentru incizia ADN în apropierea dimerului; absența polimerazei A reparatoare; absența unei activități exonucleazice care excizează nucleotid cu nucleotid fragmentul de catenă purtător de dimer; deficiența ligazei, singura enzimă capabilă să refacă discontinuitățile de catenă sub forma de crestături în care capetele catenei sînt adiacente. Aceste constatări biochimice, cît și experiențele de reparare *in vitro* cu enzime pure ale unui ADN cu dimeri au permis stabilirea următoarelor etape a căii metabolice de reparare constitutivă: 1) Etapa exciziei în care endonucleaza recunoaște segmentul purtător de dimeri și clivează monocatenar la o distanță de cîteva nucleotide de leziune prin hidroliza unui fosfodiester la nivelul legăturii 3′; 2) Etapa încorporării nucleotidice de reparare. Este o etapă catalizată de ADN-polimeraza I (sau A), folosește ca matriță catena indemnă complementară și opozantă segmentului dimerizat, încorpo-

Scanned with OKEN Scanner

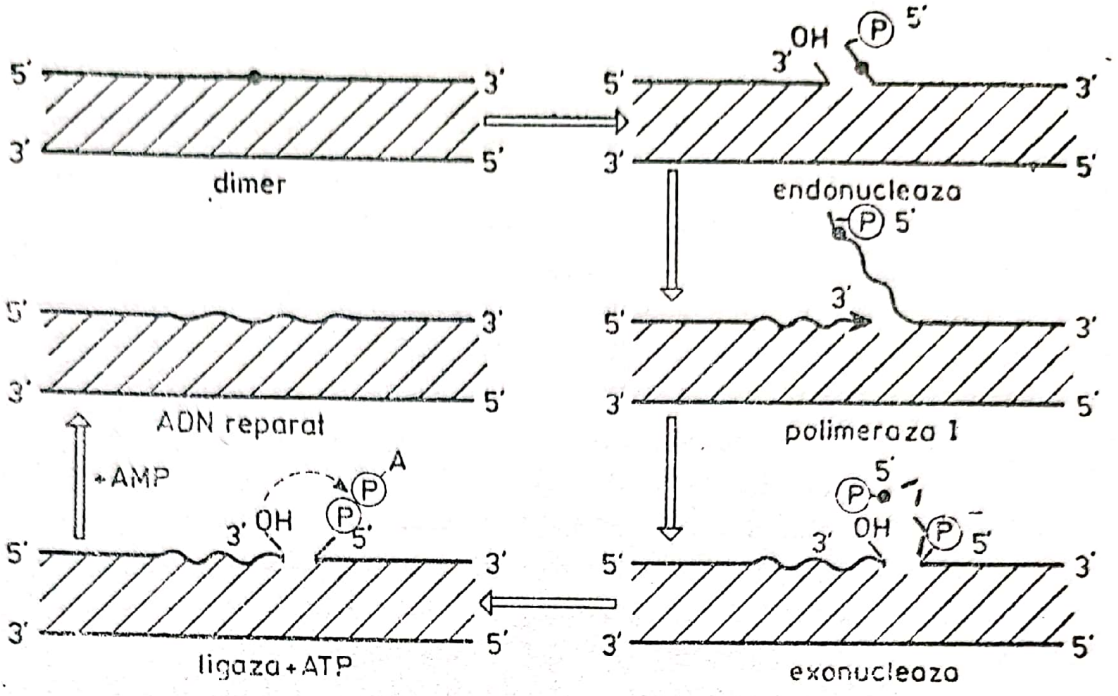


Fig. 81. **Etapele de reparare cu excizie a dimerilor ca urmare a acțiunii ultravioletelor.** P încercuit înseamnă rest fosfat. Săgeata cu linie întreruptă reprezintă atacul nucleofilic exercitat de oxidril asupra complexului adenil pirofosfat-marginea 5′ a crestăturii. Se redă mecanismul care presupune ordinea: replicare reparatorie-excizie exonucleazică. De aceea în fiecare etapă practic nu apare nici un hiat în structura bicatenară, ci numai crestături monocatenare (după Kondo, 1974, cu modificări).

rează nucleotide aflate sub formă trifosforică specificate de matriță, are ca primer marginea 3′ a crestăturii și, concomitent acestei încorporări, se desfășoară și catena purtătoare de dimer (fig. 81) care proeminează progresiv extrabicatenar: 3) Etapa de clivare a catenei dimerice catalizată de o exonuclează 5′ fosfat capabilă să secționeze nucleotid cu nucleotid catena extrabicatenară apendiciformă, prin hidroliza progresivă a legăturilor fosfodiesterice inclusiv cea torsionată dintre nucleotidele dimerizate (fără a desface însă și structura ciclobutanică). Acțiunea exonucleazei persistă pînă cînd întîlnește agregatul de polimerizare. În acest moment polimeraza I se află în prezența unei margini create de exonuclează în care extremitatea 3′ a catenei născînde se află adiacent în fața unei extremități 5′ rezultate din acțiunea exonucleazei. Configurația constituie, de fapt, o discontinuitate de tip „incizie" (engl. *nick*) și este steric nepotrivită acțiunii polimerazei. Lungimea segmentului în reparare ar rezulta deci din competitivitatea reacțională a vitezei de acțiune exonucleazică și viteza de reparare a polimerazei. Cînd prima o depășește pe cea din urmă, exonucleaza ajunge la structura bicatenară și se oprește, deoarece are specificitate numai pentru monocatenă. La acest nivel se oprește și polimeraza, deoarece nu-i capabilă să sintetizeze legătura fosfodiester între cele două extremități adiacente: 4) Refacerea structurii tip „incizie" prin intervenția ligazei. Ligaza ATP dependentă de tip fagic și eucario-

Scanned with OKEN Scanner

tic restabilește continuitatea catenei prin două reacții descrise la capitolul III. Prin cele 4 etape sistemul de reparare reface nemodificată secvența anterioară de ADN, elimină dimeri cu inelul ciclobutanic intact și consumă energia eliberată de nucleotidele trifosforice posesoare de legături macroergice. Lungimea segmentului peridimeric excizat în timpul reparării este variabilă, dar nu mai mare de 30 de nucleotide. Din descriere rezultă că în calea biochimică de reparare cu excizie este o succesiune de tip reparare prin încorporare → secționări exonucleazice, și nu invers, adică excizări exonucleazice cu formarea unui hiat mare monocatenar → umplerea hiatului prin încorporare polimerazică, așa cum se credea cu vreo 7 ani în urmă (German, 1972). Succesiunea descrisă arată că procesul de reparare evită formarea unui hiat monocatenar lung care ar constitui un sit reactiv adeziv predispus la erori de împerechere. Sistemul constitutiv de reparare cu excizie nu a fost găsit la plante (Painter, 1973), constatare care ridică numeroase probleme privind repararea leziunilor ADN în celulele vegetale. Deși complexă, calea metabolică de reparare cu excizie se caracterizează prin exactitate și sistemul enzimatic implicat conservă cu fidelitate secvența nucleotidică a ADN. Pentru o mare parte a dimerilor rezultați din iradierea cu UV sistemul reușește să repare leziunile și să elimine fotoprodușii din ADN aprioric replicării. Oricum, o parte din dimeri sînt surprinși de replicare fără a fi excizați. Bazele pirimidinice dimerizate torsionează legătura fosfodiesterică dintre nucleotidele interesate iar configurația sterică realizată nu permite împerecheri în momentul replicării. Totuși agregatul de replicare poate depăși ghemul steric aflat numai pe o catenă, sintetizează în continuare ADN și lasă la nivelul dimerului un hiat dinucleotidic (fig. 79 și 80). Leziunea postreplicativă rezultată dobîndește o nouă configurație, este de o mai mare amplitudine și de altă specificitate, enzimele sistemului constitutiv de reparare cu excizie nu sînt capabile să o mai repare.

Pentru leziunile postreplicative intervine și sistemul de reparare inductibil predispus la erori (sistemul SOS), sistem cu implicații adînci în complexul de factori care asigură recombinarea.

S-a observat că și la organismele cu sistemul constitutiv de reparare alterat mai are loc sinteza de ADN după tratamentul cu UV iar noile catene cu discontinuități la nivelul dimerilor pot fi reparate prin recombinare între moleculele surori (fig. 82). Repararea prin recombinare este posibilă, deoarece leziunile dimerice nu pot fi niciodată la același nivel în moleculele surori rezultate din replicarea unui ADN cu dimerizări. Asertiunea se sprijină pe constatarea simplă că dimerii sînt numai pirimidinici și într-o structură bicatenară resturile nucleotidice complementare primidinelor sînt numai purinice. Cînd bifurcația de replicare trece prin dreptul unui dimer, noua catenă sintetizată pe matrița cu dimer are un hiat iar cealaltă catenă nouă din bicatena

Scanned with OKEN Scanner

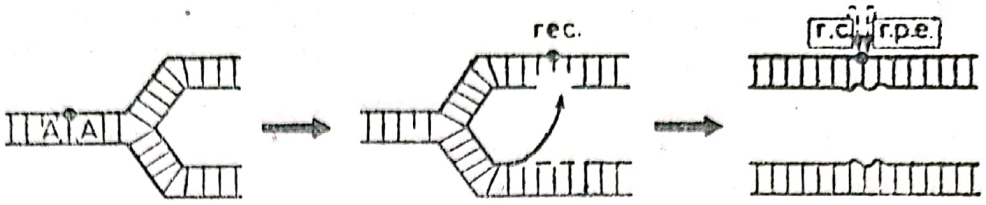


Fig. 82. **Reparare a hiatului postreplicativ prin recombinare** între molecule surori și succesiv intervenția fie a sistemului constitutiv de reparare (r.c.), fie a sistemului predispus la erori (r.p.e.). rec = recombinare.

soră este normală în dreptul dimerului, deoarece matrița ultimei catene nu are leziune (în dreptul unui dimer sînt două purine, cel mai des două adenine nedimerizante). Deoarece moleculele surori sînt vecine, ele pot interacționa și printr-un schimb nucleotidic pot să repare hiatul rămas. Refacerea hiatului prin recombinare permite să acționeze din nou sistemul constitutiv de excizie-reparare. Aceste succesiuni de recombinare → reparare constitutivă întîrzie refacerea lezională și permit să intervină sistemul SOS care între timp a fost indus. Inducția SOS este posibilă, deoarece repararea prin recombinare este mai lentă (fig. 80). Existența sistemului SOS, deși încă incomplet elucidat, este sprijinită de observații experimentale obținute în modele experimentale care au utilizat ultraviolete iar ca material biologic bacteriofagi, bacterii și culturi de celule umane derivate din biopsii tegumentare de la bolnavi cu variante diferite de xeroderma pigmentosum. Dintre diferitele constatări se prezintă în continuare cîteva mai demonstrative: 1) Infectarea cu bacteriofagi neiradiați a bacteriilor gazdă iradiate cu UV duce la creșterea frecvenței mutațiilor la bacteriofagi. Această constatare sugerează că în bacterii au fost induși prin UV factori care modifică secvența nucleotidică a ADN fagic; 2) Iradierea fagului Φ x 174 cu UV produce o puternică inhibiție a sintezei de ADN fagic în celula gazdă, deși pătrunderea ADN fagic are loc. S-a apreciat că este suficient un singur dimer pe moleculă de ADN Φ x 174 monocatenar pentru a bloca replicarea. Și totuși iradierea cu UV a fagului Φ x 174 cu o doză care produce 7—8 dimeri pe moleculă și infectarea de celule gazdă iradiate în prealabil au permis sinteza de ADN fagic, ceea ce sugerează că UV au indus în celula gazdă sinteza de factori reparatori care salvează ADN fagic. Posibilitatea intervenției sistemelor constitutive a fost exclusă, deoarece incubația s-a efectuat la întuneric iar sistemul de reparare prin excizie nu poate acționa asupra ADN monocatenar. Infecția bacteriilor neiradiate cu o probă din același lot de fagi iradiați nu a fost urmată de replicarea ADN fagic. Dacă celulele iradiate sînt cultivate în prezența cloramfenicolului, ele nu mai sînt capabile să asigure replicarea ADN fagic. În consecință, factorii SOS sînt de natură proteinică, deoarece cloramfenicolul este un inhibitor clasic al sintezei de proteine bacteriene (cap. VIII); 3) Xeroderma pigmentosum este o boală ereditară autozo-

Scanned with OKEN Scanner

mală recesivă caracterizată prin sensibilitate tegumentară excesivă la iradierea solară. Bolnavii prezintă leziuni tegumentare, țesutul cutanat dezvoltă carcinoame multiple și mor de timpuriu. S-a descris și o formă cu leziuni neurologice. Din biopsii tegumentare de la bolnavi s-au obținut culturi de fibroblaști la care s-a demonstrat că defectul molecular constă în incapacitatea celulelor de a elimina dimeri din ADN după expunere la UV. S-a demonstrat astfel că sistemul constitutiv de reparare-excizie este deficitar, stabilindu-se că enzima defectă este endonucleaza specifică dimerilor care acționează la prima etapă a căii metabolice de reparare (Setlow și colab., 1969) (fig. 81). Totuși mai recent au fost depistate cazuri de xeroderma pigmentosum care, deși au un sistem constitutiv de reparare-excizie normal, prezintă defecte importante în reparările postreplicative (Lehman și colab., 1975) ; 4) la bacterii s-a mai observat că sistemul SOS este inductibil prin tratament termic controlat și că dezvoltarea capacităților sale de a crește rata de mutații prin UV depinde de factori de recombinare.

4. *Incriminarea sistemelor de reparare din mutageneza UV și în repararea leziunilor induse de alți mutageni*. Studiindu-se structurile ADN la celule bacteriene, bacteriofagi și celule de eucariote tratate cu mutageni diferiți, s-a ajuns la concluzia că majoritatea leziunilor ADN induse chimic sînt reparate fie de aceleași sisteme reparatorii implicate în restaurarea ADN prejudiciat de UV, fie de sisteme analoage care diferă în funcție de specificitatea chimică a leziunii și care sînt mai puțin cunoscute.

Alterările induse de radiațiile penetrante, pe lîngă modificări ale bazelor, produc ruperi monocatenare și bicatenare transverse într-un raport de 9/1. Repararea ruperilor monocatenare are loc rapid și se realizează prin inserția de baze la nivelul rupturii, ceea ce semnifică fie o pierdere nucleotidică în momentul acțiunii radiațiilor, fie secționări nucleotidice postlezionale urmate de încorporări reparatoare printr-un mecanism analog celui de la UV. Secționările postlezionale ar avea rolul de a elimina și alterările bazelor din jurul rupturii monocatenare. Pînă în prezent nu s-au observat astfel de reparări la plante, fapt care coincide cu absența sistemului de reparare-excizie la organismele vegetale (Painter, 1974). Intervenția sistemului constitutiv de reparare-excizie în leziunile altor agenți mutageni este sprijinită și de faptul că organismele deficitare în sistemul de reparare și sensibile la UV au mare sensibilitate și la acțiunea radiațiilor penetrante, și la agenții chimici. Ruperile bicatenare transverse provocate de iradieri penetrante reprezintă 10% din leziunile dezintegrante ale ADN provocate într-o expunere. Pînă în prezent, sînt cunoscute puține date asupra reparărilor implicate în aceste leziuni, iar cele existente sînt controversate.

Sistemul excizie-reparare se angajează și în înlăturarea leziunilor provocate de agenții alchilanți (azot-mușt ar, sulfur-iperită, etil-metan-

Scanned with OKEN Scanner

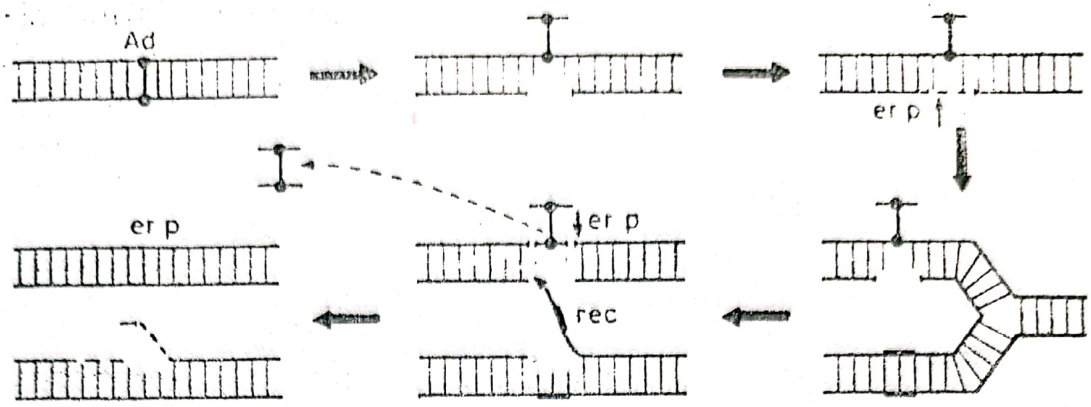


Fig. 83. **Un aduct (legătură transversă) și eliminarea lui prin stadiul de monoaduct.** Greutatea eliminării lui duce fie la efect letal, fie la reparare cu erori prin recombinare, sau prin sistemul SOS (er.p.).

sulfonat) de 4-nitro-chinolină, de mitomicina C, de acid nitros, cît și cele induse de psoralen (furocumarină) (Witkin, 1969, Howard-Flanders și Liu, 1973). Mutagenii chimici menționați stabilesc legături transverse între structurile bicatenare denumite din acest motiv legături aductoare sau aducți. Aducții solicită mecanisme de reparare care necesită și etape postreplicative. Într-o primă etapă are loc excizia perilezională a unei catene iar nucleotidul interesat în legătura transversă rămîne legat de catena complementară neexcizată ca un apendice extrabicatenar, denumit monoaduct (fig. 83). În etapa a doua se dezvoltă un mecanism de inserție nucleotidică încă neprecizat prin care se reface hiatul rămas, reconstituindu-se o structură bicatenară cu monoaductul legat. Monoaducții sînt în continuare agenți perturbatori ai conformației ADN și în replicare induc din nou hiaturi monocatenare. Eliminarea lor se efectuează fie prin recombinări postreplicative între moleculele surori, fie prin sistemul SOS. În aceste reparări intervin și factori comuni recombinării, deoarece la bacterii și eucariotele inferioare mutanții deficitari în capacitatea de recombinare sînt concomitent inapți în eliminarea leziunilor induse de mutageni. Laval (Nature-London, *269*, 829—832, 1977) a descris enzima N_9—$C_{1'}$-glucozidaza capabilă să desprindă purinele metilate ca N—3 metiladenina și C—6 metilguanina rezultate din alchilare, producînd goluri catenare apurinice. La nivelul hiaturilor apurinice, acțiunea unei endonucleaze specifice pentru situri apurinice provoacă ruperi monocatenare care sînt apoi antrenate în reparări fie prin mecanisme asemănătoare celor caracteristice leziunilor UV, fie prin procese asemănătoare recombinării.

3. **Mecanismele moleculare ale recombinării.** Genoamele unitare, de la plasmide și pînă la eucariotele superioare, sînt combinări organizate de gene. Dacă două genoame genetic omoloage se află în aceeași celulă, cele două combinări de gene pot să-și schimbe reciproc sau nereciproc

fragmente de material genetic de dimensiuni variabile și să formeze noi combinări de gene, adică *recombinări*. Recombinările sînt condiționate însă, pe lîngă potrivirile macrostructurale fiziologice și cele celulare gametice ale interschimbului genetic, de omologii structurale ale ADN aparținînd la cele două genoame care au ajuns să se afle în aceeași citoplasmă. Limitările naturale de recombinare aflate la nivele diferite ale organizării viețuitoarelor constituie mecanismele de bază ale delimitării speciilor și criteriul definirii speciei ca „un grup de organisme care pot avea interschimb genetic" (Dobzhansky, 1951). Organismele progene purtătoare de recombinări se numesc recombinanți iar totalitatea factorilor care guvernează procesul de recombinare se numește sistem de recombinare. La organismele sexuate procesul de zigotizare însuși ca fază vitală inițiatoare de ontogeneză constituie o nouă combinare de gene și ca urmare fecundația este însoțită de recombinare iar toate organismele sînt practic recombinanți ai genitorilor sexuați. De fapt, la aceste organisme sînt trei nivele la care se desfășoară recombinarea : a) combinarea la întîmplare a gameților în procesul fecundației ; b) asortarea independentă și întîmplătoare a cromozomilor în seturi haploide de cromozomi, în momentele diviziunii gametogene ; c) interschimb de gene între cromozomi omologi prin *crossing-over*. Astfel, prin recombinare genetică se înțelege oricare proces prin care doi sau mai mulți parentali (organisme multicelulare, celule sau molecule păstrătoare de informație genetică) cu caractere genetice diferite se împerechează, interacționează și dau naștere la progeni la care genele parentalilor se găsesc în noi combinații denumite recombinanți (ADN recombinant, ARN recombinant, indivizi recombinanți, celule recombinante). Această definiție sugerează complexitatea de factori implicați în asigurarea recombinării la organismele superioare, cu acțiuni diverse asupra fecundării, în momentele și treptele diferite ale meiozei, cît și la nivelul proceselor bazale de schimbare a secvențelor de gene, fragmente de gene și nucleotide. Potrivit acestei definiții, modalitățile moleculare ale recombinării cuprind următoarele : mecanismele care controlează segregările și asortările de cromozomi ; căile prin care acizii nucleici interacționează și conduc la schimbări în secvențele genelor sau la schimbări de secvențe nucleotidice intragenice.

1. *Date care indică un control molecular al segregării și asortării cromozomilor în meioză*. Studiile procesului de meioză la diferite organisme și implicit la om au indicat diferențe între sexe referitor la frecvențele de recombinare prin *cross-over*. Diferențele constante dintre sexe, observate, de exemplu, la *Drosophila* și la om, indică intervenția unor factori dependenți de sex care intervin în controlul meiozei.Cercetarea sistematică a meiozei la bărbați a permis evidențierea de subiecți hipochiasmatici asemănători unor mutanți de recombinare, deoarece acest caracter s-a constatat a avea distribuții familiale (Hulten, 1974).

Scanned with OKEN Scanner

Date numeroase indicatoare ale unui control multifactorial al meiozei îl oferă însă sistemele de model experimental care au utilizat *Drosophila*. La acest organism s-au indus mutații care au demonstrat implicația a aproximativ 40 de loci ale căror gene codifică produși participanți atît în controlul, cît și în îndeplinirea diferitelor etape din asortarea și segregarea cromozomilor în meioză (Sandler, 1974). Astfel, au fost evidențiate următoarele categorii: a) gene care influențează frecvența recombinărilor meiotice la masculi și femele; b) gene care controlează distribuirea chiasmata de-a lungul cromozomilor; c) gene implicate prin produsele codificate în separarea centromerilor omologi în anafaza I; d) gene codificatoare ale factorilor care asigură regularitatea de scindare a centromerilor frați în anafaza II; e) activități genice care condiționează capacitatea cromozomilor de a se mobiliza spre polii anafazici și comportarea cromozomilor gametici după fecundație. În afară de *Drosophila*, au mai fost izolați mutanți deficitari în recombinare meiotică și mitotică la levuri, la *Ustilago maydis* și la alți fungi (mutanți denumiți rec⁻) care oferă subiecte de ales pentru lămurirea la nivel superior a recombinării în sistemele supraorganizate ale eucariotelor. Deși aceste date indică fără ambiguitate factori și căi organizate de îndeplinire a evenimentelor de recombinare intergenomică și intracromozală la nivelul meiozei, este dificil de conceput numai pe baza lor etapele ordonate ale controlului molecular al meiozei. În schimb, cunoașterea structurii ADN, a enzimelor și factorilor implicați în metabolizarea lui, în particular la bacterii și bacteriofagi, permite discutarea mecanismelor moleculare ale recombinării prin *crossing-over* la nivelul ADN, în termeni mai clari. Totuși, recombinarea la nivelul ei bazal este încă relatată sub forma de modele, adică descrieri de evenimente ale unui proces complex cu multe etape și cu participare multifactorială, prin care se explică logic trăsăturile observate experimental (Hotchkiss, 1974).

2. *Recombinarea la nivelul molecular al ADN este o cale metabolică.* La acest nivel, un eveniment de recombinare genetică (un *crossing-over*) este considerat ca o serie de interacțiuni între două macromolecule de ADN cu regiuni omoloage care conduc la schimb reciproc sau nereciproc de segmente de mărimi variate (un nucleotid, fragmente de genă, gene întregi, grupări de gene). Seria de interacțiuni poate fi rezumată prin două reacții între două molecule de ADN cu segmente omoloage BDEF și respectiv bdef:

$$BDEF + bdef \rightarrow BDeF + bdEf \quad (1)$$

$$BDEF + bdef \rightarrow BDeF + bd + E + f \quad (2)$$

Reacția (1) se referă la schimb reciproc, iar (2) la schimb nereciproc. Cum segmentele susceptibile interschimbului sînt părți din molecule unitare bicatenare de ADN, înseamnă că recombinarea presupune:

Scanned with OKEN Scanner

raporturi sterice apropiate dintre regiunile omoloage (sinapsă moleculară) ; ruperea moleculelor de ADN la nivele apropiate ; translocarea segmentelor rezultate din ruperi ; reunirea segmentelor. Cu alte cuvinte, recombinarea presupune un şir de reacţii care se succed în cascadă şi care în condiţii naturale necesită enzime capabile să desfacă legături covalente, factori sterici care să asigure stabilitatea macromoleculelor ADN în poziţii potrivite reacţiilor, enzime sintetizatoare de noi legături covalente, adică o cale metabolică de mare complexitate potrivită nivelului macromolecular la care se desfăşoară. Considerînd recombinarea ca o cale metabolică în care reactanţii precursori sînt molecule de ADN omoloage iar produşii finali, molecule de ADN cu interschimb de segmente, trebuie să se cunoască următoarele : a) enzimele, proteinele şi categoriile de ARN angajate în calea metabolică ; b) produşii intermediari între precursori şi produşii finali ; c) etapele în care se desfăşoară ; d) reglarea sintezei şi activităţii enzimelor implicate ; e) conexiunile şi suprapunerile acestei căi metabolice cu alte căi în care sînt implicate macromoleculele păstrătoare de informaţie genetică. Progresele cunoaşterii permit în prezent o descriere coerentă şi generalizată a acestor atribute ale re combinării.

a) *Enzime şi alţi factori implicaţi în recombinare.* Aceste enzime şi factori sînt endonucleazele cu şi fără activitate exonucleazică, exonucleaze, ADN-polimeraze reparatorii, factori recombinogeni, situri cognitive de recombinare (segmente de ADN sau gene pentru recombinare), fosfataze, polinucleotid-kinaze şi ligaze.

Endonucleazele rec (de recombinare) acţionează în interiorul moleculei şi clivează hidrolitic puntea fosfodiester 5′ 3′ la nivelul legăturii 3′, în aşa fel că gruparea OH—3′ rămîne neangajată (fig. 84). Sînt capabile în mod obişnuit să producă numai crestări, dar se descriu şi unele cu activităţi exonucleazice. La *E.coli* s-a descris o endonuclează şi cu activitate exonucleazică dependentă de ATP, cunoscută sub denumirea de exonucleaza V. Are o greutate moleculară de $2{,}7 \times 10^5$d, este formată din două subunităţi codificate de gene separate denumite *rec* B şi *rec* C. Deficitul acestei enzime provocat prin mutaţii ale

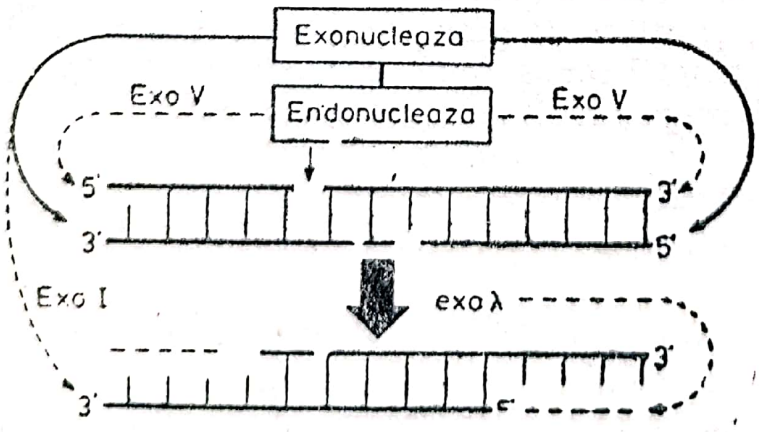


Fig. 84. **Modul de acţiune al endonucleazelor şi exonucleazelor.** Pe cînd endonucleazele acţionează în interiorul moleculei de ADN şi produc crestături, exonucleazele acţionează numai la extremităţi şi excizează monocatenele nucleotid cu nucleotid. Exo V, Exo I, şi Exo λ = exonucleaza V, exonucleaza I, şi respectiv exonucleaza λ de la sistemul bacteriofag λ—*E.coli*.

Scanned with OKEN Scanner

genelor rec B și rec C scade frecvența de recombinări la nivele joase față de tipul sălbatic, reduce restaurarea postreplicativă a leziunilor provocate de UV, rX și mitomicină C, cît și reparările constitutive. O endonucleză analoagă a fost descrisă și la *Bacillus subtilis*. La eucariotele multicelulare a fost descrisă o endonucleză produsă cu specificitate în pahiten (Stern și Hotta, 1974) și a cărei sinteză este reglată de formarea sinapsei intercromozomice din zigoten. La mutanți de *Ustilago maydis* deficitari în endonucleză s-a observat modificarea frecvenței de recombinare (Bodman, 1972). La mutanți deficitari în sinapsă de *Lilium*, cît și în prezența colchicinei inhibitor al sinapselor la organisme de tip sălbatic, cantitatea de endonucleză pahitenică este mult scăzută.

Exonucleazele de recombinare au capacitatea de a secționa nucleotid cu nucleotid porțiuni monocatenare de ADN. Sînt de trei tipuri: unele atacă ADN monocatenar, altele acționează mixt și altele atacă ADN nativ bicatenar cu exclusivitate (fig. 84). Exonucleaza I produsă de *E. coli* este din prima categorie. Este codificată de gena *sbc B* (engl. *supressor rec B, rec C*), are $5{,}5 \times 10^4$d și supresează deficiențele exonucleazei V asigurînd singură evenimente de recombinare. Exonucleaza λ codificată de gena red X a genomului de fag λ atacă ADN bicatenar la o extremitate, dezintegrează monocatena abordată în direcția $5' \rightarrow 3'$ și, în final, produce monocatene. Deși se leagă la crestături monocatenare preformate, nu-și inițiază activitatea de digestie în acest caz. S-a mai descris, tot la *E. coli*, exonucleaza VIII cu activitate exonucleazică mai puternică asupra ADN nativ, are gr. mol. $1{,}3 + 10^5$d, este codificată de gena *rec E* și este implicată în etapele recombinării. Și la organismele eucariote sînt descrise activități exonucleazice implicate în reparări și recombinări.

Endonucleazele și exonucleazele de recombinare sînt în consecință enzime hidrolitice ale ADN care scindează scheletul glucidofosforic asemănător diferitelor nucleaze degradative, lizozomale sau de export, ca DN-aza I de pancreas, DN-aza II splenică, nucleaze bacteriene difuzibile, fosfodiesteraza de venin de șarpe. Primele însă acționează în contextul căii metabolice de recombinare *in vivo* și efectele lor sînt limitate fie de situri specifice cognitive din ADN, fie de conjunctura interactivă cu ceilalți factori, fie de însăși specificitatea lor pentru acțiuni localizate producătoare de crestături, ramificări monocatenare adezive. Ultimele nucleaze, cum sînt cele de export, nu au limitările sterice ale recombinării, acționează neintegrate într-un agregat funcțional recombinant, nu au specificități de situri cognitive și descompun hidrolitic acizii nucleici fără electivitate pînă la oligo- și mononucleotide. Acestea nu sînt endo- sau exonucleaze de recombinare.

ADN-polimerazele reparatorii sau de corectare au ca reprezentant de seamă polimeraza Kornberg (1957, 1960). Denumită și polimeraza A sau

Scanned with OKEN Scanner

polimeraza I de *E. coli*, este implicată în procesele de reparare deşi la început s-a crezut că este enzima replicatoare activă în perioada S. Tot la *E. coli* s-au mai descris polimeraza II (sau B) şi polimeraza III (sau C), fiecare codificată de gene definite, *pol A* (sau *rec A*), *pol B* şi respectiv *pol C* (sau *dna E*). La numeroase eucariote s-au descris ADN-polimeraze nucleare şi citoplasmatice asemănătoare celor bacteriene şi la un moment dat părea surprinzător de ce sînt necesare atîtea polimeraze. Explicaţia constă în faptul că rolurile lor sînt diferite în funcţie de metabolismul ADN. Pe cînd unele sînt angajate preponderent în replicare (cap. III), altele sînt implicate în căile de reparare, de recuperare şi de recombinare a macromoleculelor ADN (polimeraza I şi polimeraza II).

Factorii proteinici şi neproteinici cu acţiune recombinogenă au fost daduşi şi apoi demonstraţi mai întîi la procariote şi apoi la eucariote. Pentru interacţiunile dintre moleculele ADN de mare gabarit şi mai ales în interacţiunile sinaptice dintre cromozomi, aceşti factori sînt solicitaţi cu necesitate pentru a asigura alipirea sterică omoloagă în procesele de dirijare spaţială a segmentelor ADN, cît şi în translocaţiile necesare interschimbului. Astfel, la fagul T 4 *gena 32* codifică o proteină care se leagă de ADN monocatenar şi-l menţine steric extins pentru interacţiuni cu molecule vecine de ADN. La bacterii s-au descris gene ale căror produse sînt esenţiale pentru recombinare. De exemplu, la *E. coli* sînt descrise genele *rec A*, *rec F*, *rec G*, *rec L* (Bachman şi colab., 1976). Produsele lor nu manifestă efecte hidrolitice, ci asigură competenţa celulară de recombinare prin efecte sterice de potriviri catenare şi de control. De exemplu, produsul genei *rec A* este o proteină X căreia i se atribuie roluri în medierea sinapsei intermoleculare şi a clivajelor monocatenare în poziţii avantajoase schimburilor segmentare şi în reglarea sintezei celorlalţi produşi genici implicaţi în recombinare (Sinden şi Cole, 1978). Studiile efectuate la *Lilium* au demonstrat că alinierea sinaptică dintre cromozomi este un proces independent de potrivirea sinaptică moleculară între segmente de ADN la a cărei realizare concură produse genice asemănătoare proteinei 32 şi proteinei X de la sistemele fago-bacteriene. Descoperirea de factori sinaptogeni şi translocatori de macromolecule ADN este în plin progres. Deşi funcţiile lor sînt asemănătoare, diferenţele numerice şi calitative dintre grupările taxonomice îndepărtate sînt certe, deoarece organizarea genomică a acizilor nucleici este de mare diversitate (cap VII). Implicaţiile ARN în recombinare sînt deduse din studiile efectuate în sistemul fag λ -*E.coli*, cît şi la operonul *ara* prin care se arată că transcrierea fie stimulează, fie inhibă recombinarea. Regiunile promotoare din transcriere sînt implicate în iniţierea heteroduplexelor (vezi modelul Sobell de recombinare).

Structura ADN însuşi, cît şi stările sale sterice condiţionează recombinarea. Capacitatea ADN de a avea stări ritmice intermitente

Scanned with OKEN Scanner

de înfășurare-semidesfășurare desemnată cu termenul sugestiv „mișcări respiratorii ale ADN" constituie o condiție generală pentru posibilitatea interacțiunii dintre două duplexe alăturate de ADN (Hotchkiss, 1974). Segmentele intersperse de ADN repetitiv la eucariote s-au dovedit a avea un rol decisiv în sinaptizarea moleculară la momentul de *cross-over*. Aceste segmente cu bisimetrie rotatorie de tip Gierer (1966) pot constitui situri cognitive proeminente pentru interacțiunea cu enzimele și factorii specializați controlului în sinaptizare și rupere-copiere recuperantă-reunire (Sobell, 1972).

Din acțiunea exonucleazelor și endonucleazelor pot rezulta extremități catenare fie 3′, fie 5′ ale căror grupuri OH sînt purtătoare de un rest fosforic. Prezența acestuia la 3′ constituie o piedică în acțiunea polimerazei reparatorii sau ligazei. Ca urmare, echipamentul de factori ai recombinării este dotat cu o fosfatază capabilă să defosforileze extremitățile catenelor și să formeze capete oxidril-3′ sau oxidril-5′. Pentru acțiunea ligazei, este necesar ca extremitatea 5′ să fie fosforilată iar această condiție este îndeplinită de polinucleotid-kinază, enzimă capabilă să transfere un rest fosforic de la ATP la extremitatea 5′ în situația cînd oxidrilul 5′ este liber.

Ligazele sînt enzimele care intervin ca factori finali de reconstituire a continuității catenare (cap. III). Răspîndirea lor este universală și participarea lor în recombinare este indubitabilă.

b) Produsele intermediare ale căii metabolice de recombinare — heteroduplexele. În interacțiunile din recombinare se formează intermediari la care participă segmente monocatenare ale ambelor duplexe participante de ADN. Datorită nepotrivirilor de împerechere, a distorsiunilor la care sînt expuse segmentele de lungime variabilă, cît și a crestărilor provocate de endonucleaze, catenele angajate în recombinare formează anse monocatenare neîmperecheate, segmente monocatenare care proeminează ramificat și porțiuni bicatenare. Structurile ADN formate din segmente bicatenare cu porțiuni monocatenare în ansă sau ramificate se numesc heteroduplexe ADN. Aceste structuri au fost studiate fizico-chimic la bacteriofagul T 4 (Broker și Lehman, 1971), la fagul SPP1 de *B. subtilis* (Spatz și Trautner, 1971) (fig. 98,99,100) și au fost puse în evidență și prin imagini electronooptice. Heteroduplexele apar fie datorită nepotrivirilor de baze în împerecherile dintre catenele celor doi omologi, fie datorită translocărilor incomplete în care sînt surprinse fazele recombinării. Tipuri de heteroduplex au fost puse în evidență și la eucariotele inferioare (levuri, ciuperci inferioare). Formele lor sînt variate și *in vivo* pentru fiecare heteroduplex există tendința permanentă spre a-l rezolva prin corectare în duplexe cu împerecheri complete. Datorită participării de segmente de la două molecule parentale diferite, structura heteroduplexului mai este numită ADN hibrid (ADNh). Construirea de heteroduplexe *in vitro* din spe-

Scanned with OKEN Scanner

cimene diferite de ADN purificat stă la originea manipulărilor de gene (cap. XIV).

4. **Etapele recombinării în cadrul unui *crossing-over* la nivelul ADN. Modele de recombinare și conversia genică.** Detectarea ubicuitară de factori și enzime de recombinare cel puțin analoage indică posibilitatea ca etapele metabolice ale unui eveniment de *crossing-over* la nivelul ADN să fie asemănătoare, indiferent de grupările taxonomice. În acest domeniu sînt construite logic diferite modele, fiecare din ele cu implicații convingătoare în diverse sisteme vii, procariote și eucariote. Explicarea interschimburilor moleculare de segmente ADN prin modele teoretice se datorează dificultăților în a separa reacțiile concertate suprapuse de rupere-copiere-degradare-extindere monocatenară-formare de punți intercatenare-formare de ramificații, într-un șir discret de etape reacționale definite experimental. Pînă la disecarea lor într-o secvență demonstrată prin observații dinamice directe, s-au imaginat modele teoretice al căror număr a ajuns la aproximativ 20. Acestea se împart în două categorii: 1) modele cu inițiere asimetrică singulară; 2) modele cu inițiere simetrică.

1. *Modele cu inițiere asimetrică singulară.* Această categorie de modele propune de la început roluri diferite pentru cele două molecule omoloage de ADN pe cale de a se angaja în recombinare. O moleculă este donoare de segment inițiator iar cealaltă este acceptoare. Asimetria modelului constă în prima etapă de declanșare a recombinării; întrucît aceasta se petrece inițial numai la nivelul moleculei donoare (Hotchkiss, 1974 a). Etapa de inițiere constă din ruperea unei legături fosfodiesterice din structura bicatenară a moleculei donoare sub acțiunea endonucleazei. În etapa a doua are loc desfășurarea catenei crestate cu extremitatea 3′ liberă datorită stării alternative de „respirație ADN" și mai ales unei proteine destabilizatoare. Desfășurarea este extinsă de participarea proteinelor recombinogene de tipul proteinei 32 codificată de genomul fagului T 4 sau al proteinei X de la *E. coli*. Acestea cooperează cu polimeraza I posesoare de sit specific pentru monocatene cu extremitatea 3′ liberă. Etapa a treia constă din migrarea extremității desprinse datorită extinderii ei fizice atît prin desfășurare cît și indusă de proteinele asociate. Migrarea monocatenară în afara duplexului donor este urmată de interacțiunea cu duplexul acceptor vecin prin împerecheri specifice, datorită atît omologiei structurale, cît și stărilor semidesfășurate spontane ritmice ale duplexului acceptor. În etapa a patra, polimeraza *rec* asociată extremității 3′ începe să alungească monocatena migrată prin copiere, se formează la nivelul duplexului acceptor o structură tricatenară incompatibilă steric imediat recunoscută de endonucleză; aceasta crestează monocatena din duplexul receptor neangajată în replicare

Scanned with OKEN Scanner

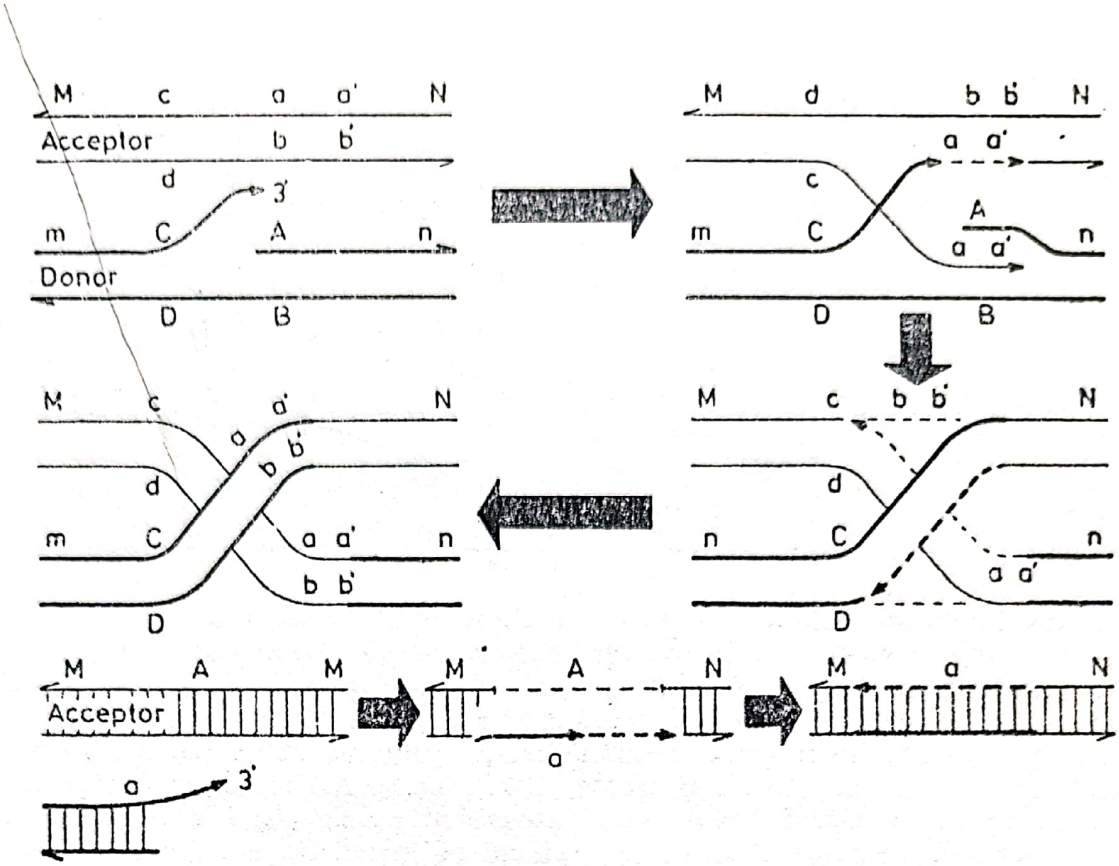


Fig. 85. **Modelul Hotchkiss de inițiere asimetrică** în care duplexul donor își mobilizează o catenă migratoare sub acțiunea unei proteine recombinogene și se insinuează în duplexul acceptor. Urmează excizii în bb' și B cu încorporări de nucleotide (linii întrerupte) și rezultă în final un schimb reciproc. Dacă donorul este un segment de ADN (ca în transformare) catena migratoare se insinuează la nivelul segmentului homolog acceptor, provoacă disimetrie de heteroduplex în care alela *A* este excizată, iar alela *a* este integrată și replicată (săgețile întrerupte). Mm și Nn = perechi alelice cu diferențe-marker în expresia genică.

și capătul *5'* exteriorizat prin copiere devine expus unei exonucleaze. Ca urmare, se stabilesc heteroduplexe (fig. 85) formate din monocatene și structuri bicatenare, legate printr-o punte monocatenară. În etapele următoare noi incizii, migrări catenare, replicări și excizii duc la inversarea structurilor de ADN bicatenar, cît și la sinteze în exces de segmente, erori de reparare care sînt traduse prin conversii genice și adiții-deleții. Aceste erori pot însoți adesea un eveniment de recombinare.

2. *Modele cu inițiere simetrică la nivelul unor situri intergenice de recombinare.* Schimbul de segmente între două duplexe ADN necesită ruperea lor simultană și învecinată pentru a favoriza posibilitatea reunirilor. Modelele simetrice vizează aceiași factori și aceleași reacții ca în modelele asimetrice de care totuși diferă prin succesiunea etapelor, prin amplitudinea reacțiilor și prin faptul că presupun segmente intergenice necesare promovării heteroduplexelor ca intermediari ai *crossing-over*-ului. Primul model simetric implicat în explicarea schimbului reciproc de segmente a fost sugerat de fenomenele de conversie genică descrise la fungii inferiori (*Neurospora*, *Ascobolus*, levuri), observate

Scanned with OKEN Scanner

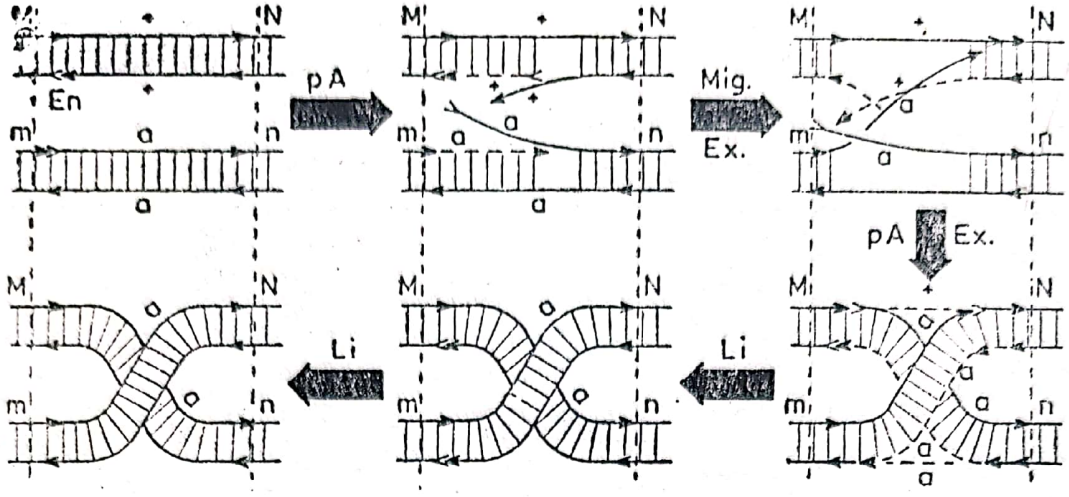


Fig. 86. **Model simetric de crossing-over** (după Whitehouse, 1965, cu modificări). M—m N—n = perechi alelice marker la distanţă de sediul *crossing-over*. + = alela sălbatică şi a = alela mutant pereche, ambele aflate în vecinătatea iniţierii recombinării; acestea sînt prinse în heteroduplex, de aceea sînt notate la fiecare catenă. pA = polimeraza A; Mig = factori de migrare asemănători cu proteina 32 a fagului T4 sau proteina pahitenică de *Lilium* (Stern şi Hotta, 1974). Ex = Activitate exonucleolitică; Li = = .ligaza; En = endonucleaza asemănătoare cu exonucleaza V de *E.coli* cu acţiune dublă endo- şi exonucleazică. Din complexul de interacţiuni, catenele alelei *a* cuprinse în heteroduplex au fost copiate cu preponderenţă, iar catenele alelei + de tip sălbatic au fost excizate în etapele de eliminare a structurilor migratoare. În expresia fenotipică ulterioară se manifestă, statistic preponderent, alela *a* ca şi cum forma sălbatică ar fi fost convertită în forma mutant. De aceea un astfel de fenomen se numeşte conversie genică.

şi la eucariotele superior organizate şi care vor fi relatate ulterior. Acest model, descris de Whitehouse (1965), presupune o unitate de recombinare situată intergenic denumită polaron, la nivelul căreia se iniţiază procesele necesare interschimbului şi formarea de ADNh (heteroduplex). Etapele se succed conform figurii 86: a) Etapa iniţială constă din scindarea de catene de polaritate opusă, cîte una în fiecare duplex la nivelul unei extremităţi a polaronului şi separarea lor de catenele complementare necrestate pe o lungime mare din polaron; b) Sinteza de noi catene pe matriţele formate din catenele necrestate; noile catene sînt apoi separate de matriţă şi fiecare migrează simultan cu monocatenele desprinse iniţial, spre omologii opuşi. Se constituie hibrizi ADN, cu punţi monocatenare stabilite prin împerecheri complementare; c) Două din punţile monocatenare sînt folosite ca matriţe pentru încorporări nucleotidice, iar celelalte două, de stabilizare, sînt hidrolizate exonucleolitic; d) Catenele neîmperecheate sînt excizate endo- şi exonucleolitic iar *crossing-over*-ul devine complet după acţiunea ligazei. Modelul prezintă un mare grad de simetrie atît în iniţiere, cît şi în întinderea hibridării moleculare. La nivelul porţiunii heteroduplex are loc şi o conversie, în sensul că segmentele alelice + şi *a* (de tip sălbatic şi mutant) în segregările ulterioare nu sînt în raportul de 1/1, ci se produc două alele mutant *a* iar alela + dispare sacrificată

Scanned with OKEN Scanner

în procesul de excizii și reparări necesare eliminării de structuri heteroduplex. Un alt model simetric, descris de Sobell (1972), materializează inițierea *crossing-over*-ului și formarea heteroduplexului, la nivelul segmentelor de ADN cu bisimetrie rotatorie care pot forma structuri de tip Gierer (ADN repetitiv intergenic, situri cognitive pentru endonucleaze, segmente operatoare adiacente genelor de structură). Modelul se bazează și pe ipoteza mai veche a lui Holliday prin care se sugera că ruperile inițiale simetrice stabilesc o suprapunere în buclă a catenelor sinaptizate, însoțită de restabilirea continuității. Suprapunerile pot migra prin alunecare de la nivelul inițial spre alte poziții ale celor două molecule angajate în heteroduplex (fig. 87). Pe baza acestor considerente, Sobell propune următoarele

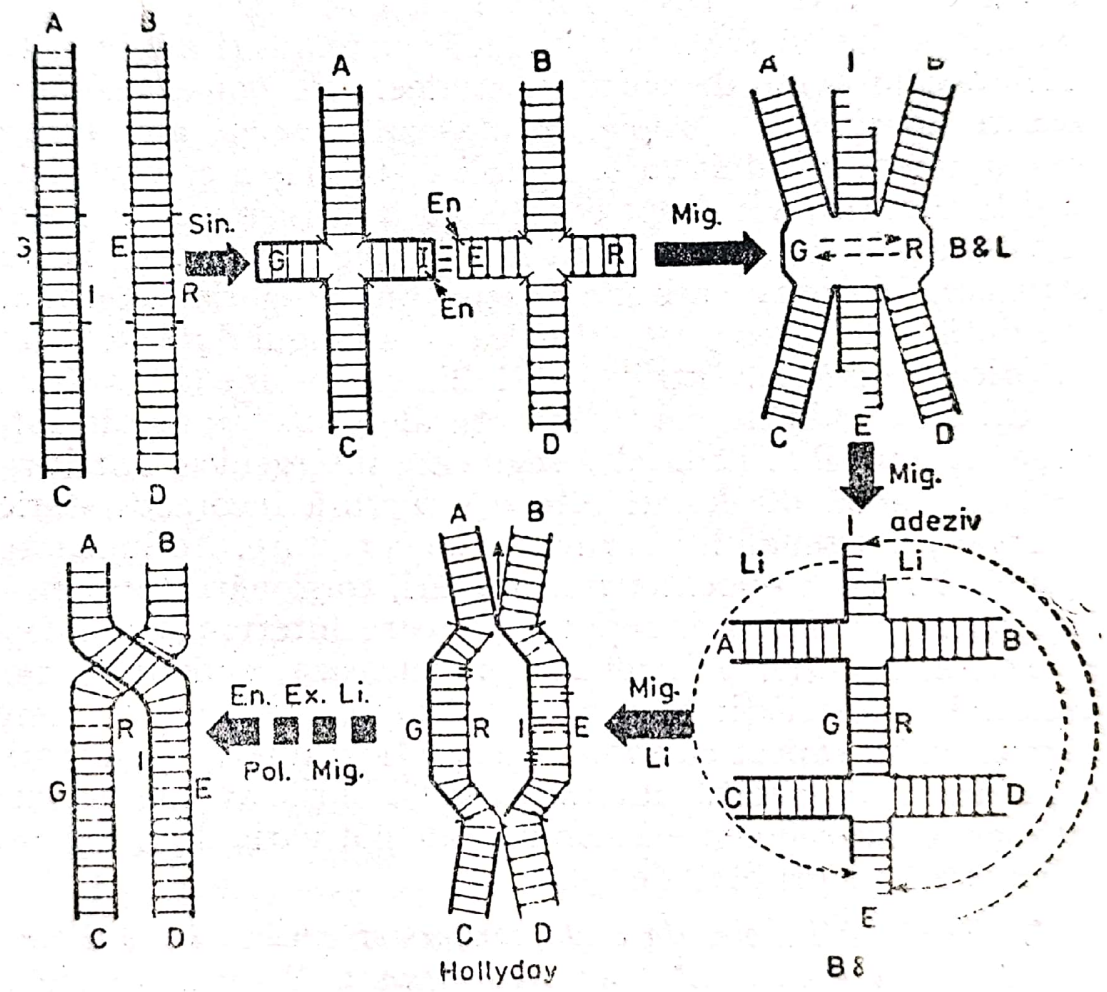


Fig. 87. Modelul Sobell de stabilire a unei structuri heteroduplex la nivelul segmentelor cu bisimetrie rotatorie de tip Gierer. G, I, E, R = catenele complementare și cu bisimetrie rotatorie; Sin = factori de sinapsă moleculară En = endonuclează; adeziv = extremități adezive rezultate din acțiunea endonucleazei de crestare; Mig = proteine pentru migrări catenare și de potrivire spațială; Li = ligaza; Pol = polimeraza; AC și BD = duplexele ADN care se angajează în recombinare. AD și BC = duplexe ADN recombinant după migrarea heteroduplexului de la nivelul structurilor Gierer; Hollyday = heteroduplex intricat monocatenar migrator (Holliday, 1974); B&L = = heteroduplex ramificat care a putut fi observat la ADN de fag T4 defectiv în ligază (Broker și Lehman, 1971) (După Sobell, 1972, cu modificări) proteinele pentru migrări și cele de desfășurare a ADN bicatenar mai sînt numite topoizomeraze.

interacţiuni. Cele două duplexe ADN leagă o proteină recombinogenă la segmentele cu bisimetrie rotatorie de tip Gierer şi le proeminează în ac de păr (fig. 87, G, I, E, R.). La nivelul buclelor se află baze neangajate în legături de hidrogen şi interacţionează stabilind o sinapsă intermoleculară. Sub acţiunea unei endonucleaze dimere de tip exonucleaza V de *E. coli* au loc două crestări, cîte una în fiecare buclă dintre cele sinaptizate şi rezultă patru catene cu baze complementare. Sub acţiunea unor proteine de extindere şi de orientare sterică se dezvoltă un ADNh în care segmentele simetrice G şi R se apropie şi se împerechează formînd o punte de legare primară între duplexurile AC şi BD într-un heteroduplex. Complementaritatea bazelor dintre catenele I şi E permite formarea de legături de hidrogen care stabilizează complexul ADNh. Faptul că endonucleaza a secţionat inegal buclele a dus la stabilirea a două extremităţi adezive. Sub acţiunea aceloraşi proteine de potriviri sterice, cele două extremităţi monocatenare adezive se apropie, se ataşează una de alta printr-o rotire cu suprapunere şi intervenţia ligazei restabileşte continuitatea catenelor I şi E. Aceasta are drept consecinţă o intricare a catenelor I R într-o manieră asemănătoare cercurilor olimpice şi conduce la formarea unei structuri Holliday care face parte din categoria heteroduplex. Odată stabilită, intricarea poate aluneca de-a lungul duplexelor împerecheate în oricare direcţie. Intricarea Holliday iniţiată la nivelul segmentelor de tip Gierer dintre genele structurale poate ajunge în interiorul unei gene structurale sau la alte segmente intergenice. Intricarea monocatenară a două duplexuri este o structură incorectă steric şi solicită intervenţia arsenalului enzimatic de corectare. Acţiunea acestuia conduce la ruperi monocatenare, migrări, torsionări, formare de extremităţi adezive, excizii şi reparări în care intervin proteine de migrare şi de translocaţie, polimeraza, exonucleaza, endonucleaze, ligaze. În ansamblul de reacţii se produc schimburi reciproce şi nereciproce de segmente. În raport cu viteza de reacţie a diferiţilor factori enzimatici şi în funcţie de poziţia intricării, schimburile au loc fie intergenic, fie intragenic, iar segmentele schimbabile pot varia de la o pereche nucleotidică pînă la grupări de gene.

3. *Explicaţii moleculare ale conversiei genice şi ale altor distorsiuni în relaţie cu evenimentul de recombinare.* Prin conversie se înţelege fenomenul genetic prin care o alelă parentală dintr-o pereche se găseşte în exces la progenii rezultaţi din împerecheri, ceea ce sugerează o convertire a unei forme alelice în perechea sa. De exemplu, în încrucişarea ABCDE x abcde, conform *crossing-over*-ului reciproc, ar trebui ca în prima generaţie de progeni numărul de recombinanţi ABCde să fie egal cu cei abcDE. Adesea însă s-a observat o creştere nemendeliană a numărului de recombinanţi de un anume tip, de exemplu cei cu alela c, ceea ce a fost numit conversie genică a alelei C în alela c. S-a observat că fenomenul conversiei genice este legat de alelele învecinate locului

Scanned with OKEN Scanner

în care se inițiază *crossing-over* și că poate interesa simultan două perechi alelice în cadrul fenomenului denumit coconversie. Explicația moleculară rezidă în existența heteroduplexelor și mecanismele de reparare și de rezoluție ale acestora. Cînd o pereche alelică este prinsă în întinderea unui heteroduplex, desfacerea monocatenară, crestările, copierea de reparare cît și exciziile pot produce fie excluderea unei alele prin excizie întinsă, fie copieri excesive ale catenelor unei forme alelice (fig. 85, 86). Coconversia de alele mutant în perechi separate indică extinderea heteroduplexelor pe distanțe întinse care pot cuprinde grupe genice întregi. Torsionările catenare din formațiile complexe tranzitorii de ADNh, corectările guvernate de enzimele de recombinare conduc la interschimburi de segmente cu mare frecvență, ceea ce influențează indicii de cartare a mutanților markeri și dau naștere la fenomenele descrise sub denumirile de „interferență înaltă negativă", neadiacență etc. (cap. XII), fenomene care, alături de conversie, au fost frecvent descrise în asociere cu evenimentele de *crossing-over*. Aserțiunea că interferența negativă, conversia, neadiacența de cartare sînt anomalii asociate hibridării moleculare și mecanismelor de corectare și rezoluție ale structurilor heteroduplex formate în *crossing-over* se bizuie pe următoarele constatări : a) anomaliile sînt asociate heteroduplexelor ; b) alele interesate în anomalii sînt adiacente locului în care are loc *crossing-over* ; c) tratamentul cu agenți mutageni care declanșează mecanisme de excizie și reparare modifică frecvența conversiilor genice și rata de apariție a interferenței negative ; d) conversiile genice singulare sînt însoțite de încorporări nucleotidice în ADN și de eliberări de nucleotide, ceea ce indică implicarea proceselor de replicare și excizie de corectare în aceste anomalii asociate pînă la integrare cu recombinarea genetică (Whitehouse, 1974). Deoarece anomaliile heteroduplexelor conduc la perturbări statistice în segregarea și asortarea mendeliană, ele au constituit în vechime argumente împotriva concepției mendeliene asupra transmisiei ereditare. Conversia genică și celelalte anomalii au avut calitatea însă de a solicita cercetări bazale care au condus la descoperirea factorilor de recombinare și mai ales la descoperirea ADN hibrid din heteroduplexe, intermediari obligatoriu necesari recombinărilor. În prezent, nu există vreo descriere a mecanismelor de recombinare în care să nu fie cuprinsă și conversia genică, manifestare moleculară frecventă a intermediarilor de recombinare. De exemplu, Hotchkiss (1974 a și b) presupune că orice recombinare genetică este însoțită și de un proces analog conversiei, care însă nu poate fi demonstrat în toate cazurile. Deoarece la prima observație conversia apare ca un mecanism asimetric (creșterea în număr a unei alele dintr-o pereche alelică), s-a afirmat că ea ar rezulta dintr-un *crossing-over* nereciproc, independent de cel reciproc și cu mecanisme proprii de apariție. În prezent, conversia genică este privită ca rezultat al unei anomalii de corectare legată de inițierea unui

Scanned with OKEN Scanner

crossing-over şi de rezolvarea reparatoare a intermediarilor metabolici heteroduplex.

5. Reglarea cantitativă a recombinării şi diversitatea acesteia. Atît enzimele de corectare şi iniţiere a recombinării, cît şi funcţiile celorlalţi factori de recombinare mai puţin cunoscuţi indică o diversificare a căilor metabolice de recombinare. În prezent nici unul dintre modelele de recombinare nu poate fi exclus, deoarece atît cele cu asimetrie de iniţiere, cît şi cele simetrice pot fi aplicate în mod variat la condiţiile diverse în care se desfăşoară recombinarea. De exemplu, modelele asimetrice pot explica mai plauzibil evenimentele de recombinare cu schimb nereciproc întîlnite la virusuri, recombinările procariotice prin transducţie şi transformare, recombinările conjugării. În transformare, segmentele de ADN sînt prelucrate pentru integrare din etapa timpurie a captării la nivelul peretelui celular, de sisteme endo- şi exonucleolitice de suprafaţă şi odată pătrunse intracelular sînt dotate cu extremităţi 3′ libere capabile de „agresiunea" asimetrică asupra genomului receptor. Din această interacţiune se integrează o singură catenă din fiecare segment donor, catena integrată constituind matriţa pentru reconstituirea în duplex prin acţiunea polimerazei I şi ligazei (fig. 85). Într-o măsură analoagă segmentele transduse de fag sau genomii fagici capabili de integrare prezintă extremităţi adezive care prin omologia structurală se insinuează la nivelul secvenţelor cognitive (de împerechere specifică) din genomul celulei acceptoare. În acelaşi mod se pot interpreta şi recombinările din conjugarea bacteriană. În schimb, modelele simetrice pot explica mai realist recombinările cu schimb reciproc de segmente, deşi interacţiunea simetrică iniţială nu este exclusă nici în schimbul nereciproc de la procariote şi virusuri.

Diversitatea căilor de recombinare este evidentă chiar de la nivelul taxonomic inferior al sistemelor fago-bacteriene şi al plasmidelor. Deşi recombinarea interfagică sau interplasmidică are loc în natură numai intracelular şi ar putea angaja arsenalul de factori recombinogeni ai celulei gazdă, totuşi o mare parte din bacteriofagi şi plasmide codifică factori proprii de recombinare (exonucleaza λ, ligaze fagice, polimeraze reparatorii fagice, alţi factori recombinogeni proprii). La *E.coli*, Clark (1974) descrie cel puţin trei căi diferite de recombinare; calea *rec* BC cu endoexonucleaza V; calea *rec* E în care participă exonucleaza VIII şi calea *rec* F dependentă de un factor recombinogen probabil neenzimatic. Presupunînd existenţa de căi diferite intraspecifice de recombinare şi la eucariote, Whitehouse (1974) subliniază că diversitatea căilor este necesară pentru a asigura desfăşurarea în condiţii diverse a recombinării, proces important care asigură nu numai supravieţuirea individului, dar şi a populaţiei din care face parte.

Deşi majoritatea căilor de recombinare nu sînt elucidate la nivelul

Scanned with OKEN Scanner

înalt de precizare neechivocă a secvențelor de etape, date experimentale sugerează existența reglării cantitative în expresia genică a factorilor *rec*. În afară de controlul integrării recombinative a fagului λ(cap.X) și a proteinei X codificată de gena *rec* A la *E. coli* implicată în controlul inițierii și sintezei de factori ai recombinării (Clark, 1974; Sinden și Cole, 1978), au fost descrise relații și interacțiuni care pledează pentru mecanisme de control și la eucariote. La eucariote recombinarea meiotică are mai multe etape care pot fi rezumate astfel: sinapsa cromozomală; presinapsa moleculară de duplexe ADN; sinapsa de duplexe-formarea de ADNh (heteroduplex); rezoluția heteroduplexului și formarea de duplexe recombinante. Sinapsa cromozomală din zigoten controlează etapele ulterioare prin asigurarea configurației fizice necesare recombinării. Expresia endonucleazei pahitenice numai în această fază indică un mecanism de control cantitativ al sintezei acestei enzime (Hotta, 1978). La *Neurospora* s-au descris represori de recombinare cu acțiune dominantă. Acești represori afectează regiuni limitate din cromozom nelincate de genele codificatoare și inhibă formarea de heteroduplex. Deși sînt și alte date care argumentează existența unui control al recombinării, studiile sînt în plin progres și este dificil a schița un model plauzibil de reglare a recombinării.

6. **Conexiunile și suprapunerile recombinării cu mutația, replicarea, degradarea și transcrierea ADN ca metabolit macromolecular.** Conturînd o privire de ansamblu asupra sintezei ADN, reacției de transcriere și a segmentelor genice de control, asupra căilor constitutive și inductibile ale reparărilor mutaționale, devine evident că numeroși factori, enzime și procese sînt comune sau manifestă o asemănare deosebită. Modelul de replicare a ADN include un echipament enzimatic (polimerază, endonuclează, ligază, enzime rotatorii de desfășurare), întîlnit și în reparările mutaționale și în recombinări. Segmentele cu bisimetrie rotatorie sînt implicate în activarea și inactivarea genică, în inducția și represia genică, în inițierea recombinării. Considerînd comparativ bifurcația de replicare discontinuă, un heteroduplex de recombinare și un agregat de reparare mutațională prin recombinare, se observă mari analogii structurale între diferitele complexe tranzitorii, deși acestea sînt situate pe căi diferite ale metabolismului ADN. În sens biochimic, ADN este un compus metabolic esențial cu un înalt nivel de activitate în cursul întregii ontogeneze. Sinteza replicativă condiționează creșterea și dezvoltarea iar transcrierile programate și reglate cantitativ asigură sintezele proteinice după un orar biologic stabilit. Metilările ADN îl protejează de acțiunea enzimelor de restricție (cap. XIV), iar dacă primele nu au loc, enzimele restrictive încep degradarea lui. Procesul de degradare a ADN are loc în diferite țesuturi și celule ale organismului și astfel ADN constituie o sursă de nu-

Scanned with OKEN Scanner

cleotide din care o parte sînt recuperate și refolosite drept cofactori energetici sau în resinteza ADN. Prejudicierea ADN prin agenți mutageni declanșează căi metabolice de reparare constitutive sau inductibile care reconstituie macromoleculele ADN. În aceste reconstituiri, mai ales în cele SOS, adesea se reface numai continuitatea lanțurilor glucidofosforice iar secvența de baze se restabilește eronat. Așa cum s-a mai relatat în capitolele anterioare, ADN ca metabolit macromolecular are situri cognitive pentru proteine variate, are schimbări ritmice de înfășurări-desfășurări care relevă segmente monocatenare și chiar brațe monocatenare și crestături. Cum subliniază Clark (1974), cînd căile metabolice se petrec într-un sistem celular în care există ADN de același fel (celulă bacteriană teoretic lipsită de plasmide) intermediarii comuni ai ADN își continuă imperturbabil căile respective de replicare, circularizare, reparare, restricție-degradare, transcriere. Cînd aceste procese se petrec în prezența unui ADN omolog introdus din afară, atunci segmentele monocatenare și alte situri cognitive declanșează interacțiuni între moleculele ADN și se inițiază o cale metabolică nouă care folosește o multitudine din factorii celorlalte căi, și anume calea (sau căile) recombinării. De aceea, Clark definește recombinarea ca un șir oarecare de etape sau căi metabolice în care acizii nucleici interacționează și au ca rezultantă o schimbare în lincajul genelor, sau a nucleotidelor în cazul recombinărilor subgenice. Interconectarea și suprapunerea cel puțin parțială a căilor metabolice ale ADN (fig. 88) îndreptățesc aserțiunea că la nivel molecular

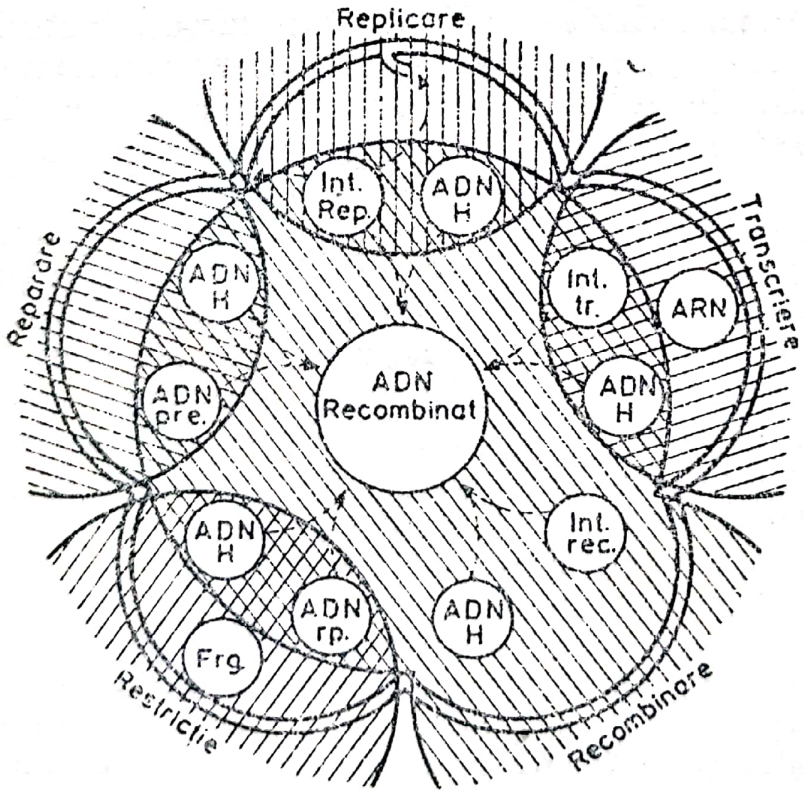


Fig. 88. Interpunerile căilor de recombinare cu celelalte domenii ale metabolismului ADN (după Clarck, 1974). ADN H = ADN hibrid sau structuri asemănătoare heteroduplexelor. Int = intermediari: Int-Rep = de replicare; Int-tr = de transcriere. ADN pre = ADN prejudiciat. ADNrp = ADN fragmentat de mecanismele de restricție. Rozeta centrală figurată cu linii duble este ADN. Semicercurile cu suprapuneri reprezintă diferitele arii metabolice ale ADN cu suprapuneri față de recombinare.

Scanned with OKEN Scanner

întrepătrunderea mutației și recombinării este evidentă. Numeroase studii demonstrează că sistemele SOS de reparare predispuse la erori au factori comuni și căilor de recombinare. De exemplu, celulele bacteriene deficitare în polimeraza I (mutanții bacterieni pol A) sînt deficitari și în recombinare, dar și în mutageneza cu UV, radiații ionizante și alți agenți mutageni. Mutanții *rec B* și *rec C* deficitari în exonucleaza V, pe lîngă deficitul de recombinare, nu răspund mutațional la o serie de agenți mutageni. Mecanisme asemănătoare recombinării, ca inserția ADN de fag λ în genomul bacterian, induc mutații bacteriene în genele codificatoare ale enzimelor de metabolizare a galactozei. Totuși, întrepătrunderea recombinărilor și mutațiilor are limite indicate de existența de gene interesate cu predominanță în controlul mutațiilor și care aparent nu afectează recombinarea. Aceste gene, denumite mutatoare, sînt implicate mai ales în procesul replicării și sînt corelate cu teoria copierii eronate. În sens clasic, prin gene mutatoare se înțeleg acele gene a căror prezență crește frecvența mutațiilor spontane ale celorlalte gene din genom. Au fost descrise mai întîi la fungii inferiori și bacterii și ulterior și la eucariotele superioare. Cercetările moleculare ale mutațiilor care au dus la mutanți cu gene mutatoare au demonstrat că genele mutatoare sînt forme alelice alterate ale genelor codificatoare ale polimerazei III de replicare (gena *pol C* la *E. coli*), ale genei care codifică timidilat-sintetaza și ale genei codificatoare a 5-dCMP-hidroxi-metilazei (Drake, 1973). Mutațiile mutatoare produc forme alelice ale căror codificări alterează fidelitatea polimerazei de replicare (polimeraza III) și rata de sinteză a dTMP și dHCMP. La *E. coli* au fost descrise o serie de gene mutatoare (mut T, mut S, mut D) cărora, deși cresc rata mutațională, nu li s-au precizat produsele fenotipice. Derivații mutaționali ai genei Mut T (mutatorul Treffers) sînt corelați direct cu perturbarea funcției replicative a polimerazei III și au capacitatea să inducă o frecvență crescută de transversii AT $\leftrightarrows$ CG. Genele Mut S și Mut L cresc la nivel înalt tranzițiile AT $\rightleftharpoons$ GC iar mut D produce mutabilitate ridicată în mod generalizat stimulată de timidină (Bachmann și colab., 1976). Unele alele mutatoare interesează însă proteine implicate în recombinare, cum sînt alela mutatoare de proteină 32 la fagul T 4, sau alele mutatoare denumite *hm*, ale căror produse neidentificate sînt implicate în reparările generalizate. Ca un revers al genelor mutatoare s-au descris gene antimutatoare sau factori antimutatori definiți prin caracterul lor de a scădea frecvența mutațiilor spontane sau induse. Antimutatorii sînt corelați cu forme moleculare deficitare ale factorilor din sistemul SOS predispus la erori mutaționale.

7. O parte din mutațiile punctiforme și marile schimbări structurale nu pot fi explicate decît prin prejudicii mutaționale și recombinări luate împreună. Excluzînd de la început mutațiile genomice cla-

Scanned with OKEN Scanner

sice care, evident, sînt anomalii de recombinare apărute ca perturbări ale aparatului mitotic în funcţia de segregare şi asortare corectă a cromozomilor în meioză sau mitoză, alterările structurale ale cromozomilor, vizibile microscopic, sînt asemănătoare ca mecanism şi nomenclatură cu alterările subgenice de la nivel molecular.

1. *Transversiile, inserţiile şi deleţiile punctiforme sînt analoage translocaţiilor cu adiţie şi deleţie la nivel cromozomal.* Cunoscînd restricţiile de împerechere specifică A-T şi G-C în procesul replicării, este dificil dacă nu imposibil să se explice transversia, inserţia şi deleţia de la nivel punctiform prin teoria copierii eronate. În cazul transversiilor ar putea fi implicate produse mutatoare codificate de gene mutatoare de tip Mut T, cu capacitatea de a lărgi registrul steric al polimerazei III şi de a permite împerecheri purină-purină şi pirimidină-pirimidină. Dar pînă la elucidarea mecanismului mutator transversia este mai plauzibil explicată prin erori de reparare ale unui agregat asemănător heteroduplexului în care intervine arsenalul de enzime şi factori vizat atît în sistemul SOS, cît şi în sistemul de recombinare. Inserţiile şi deleţiile de o singură pereche nucleotidică sînt neîndoielnic consecinţa unui proces de reparare a unei structuri de tip ADNh în care „translocarea" unui nucleotid din celulosol şi fixarea lui în plus în procesul de corectare constituie inserţia, iar pierderea unui nucleotid prin excizie nucleolitică excesivă conduce la deleţie. Dacă în loc de un nucleotid se consideră angajate segmente cromozomice microscopic vizibile şi în aceste cazuri procesul de schimbare este analog.

2. *Interpretări moleculare ale translocaţiilor, adiţiilor, deleţiilor, inversiilor, alterări de structură microscopic vizibile.* Înţelegînd prin structuri omoloage acelea care au parentali comuni sau strămoşi comuni şi considerînd că declanşarea recombinărilor se produce cînd genoame omoloage se găsesc în aceeaşi citoplasmă, atunci ar trebui ca la organismele diploide şi implicit la om, omologiile cromozomilor materni şi paterni să producă un continuu haos de interschimburi şi heteroduplexe. Organizarea genomică însă limitează aceste interschimburi. Fiecare cromozom are o organizare închisă prin palindroame telomerice şi proteine bazice şi nu prezintă regiuni adezive (sinaptizante), gradul său de adezivitate (engl. *stickiness*) fiind foarte redus. La celulele germinative, specializate în recombinarea meiotică gradul de adezivitate creşte şi se dezvoltă sinapsele intercromozomale odată cu organizarea complexelor sinaptinemale. Totodată, sînt sintetizate endonucleaze de crestare a ADN şi proteine translocatoare de tipul proteinei *X* de la *E.coli* (Hotta, 1978). În acest context se produc extremităţi adezive monocatenare şi heteroduplexe migratoare de tip Holliday-Sobell. În momente ale desincronizării între excizii şi reparări, cît şi în contractările de condensare şi relaxările de decondensare (cromozomii au molecule contractile de tip actină şi miozină) se rup fragmente mari de talia unei gene sau multigenice. În condiţiile unei multitudini

Scanned with OKEN Scanner

de heteroduplexe, soarta fragmentelor rupte este diferită. Fragmentul care nu-şi părăseşte cromozomul poate să aibă o mişcare rotatorie de 180° şi să se ataşeze prin acţiunea ligazei dînd naştere la inversie (fig. 89). Fragmentul rezultat poate părăsi plasamentul său iniţial, să fie translocat printr-o decondensare şi să întîlnească extremităţi adezive într-un alt cromozom. La acesta din urmă se stabilizează prin eventuale sinteze de reparare şi prin acţiunea ligazei. Cromozomul părăsit de fragment este donor şi deletat, al doilea este cromozom acceptor cu un segment translocat (adiţionat). Perpetuarea leziunilor de deleţie şi adiţie prin translocaţie depinde de două segmente esenţiale pentru reorganizare: telomerul şi centromerul. Cînd cromozomul deletat nu-şi recuperează telomerul printr-un proces de reparare, extremitatea sa ruptă îşi leagă extremităţile moleculelor de ADN, centromerul se divide, rezultă o structură dicentrică iar mobilizările contrare ale celor doi centromeri provoacă o punte cromozomală care se rupe în final cu pierderi de fragmente. Sinteza de ADN şi fuziunea ulterioară fac din nou o punte care se rupe iarăşi, iar mecanismul se repetă pînă cînd întregul cromozom este fragmentat şi pierdut. Acest mecanism de pierdere cromozomală se numeşte rupere-fuziune-punte (engl. *breakage-fusion-bridge*) (fig. 89.). Cromozomul deletat se stabilizează numai în condiţia în care la extremitatea ruptă partea purtătoare de centromer îşi ataşează telomerul. De aceea, deleţia stabilă este condiţionată de o poziţie sterică favorizantă captării telomerului (fig. 89). Ca mecanism general, aberaţiile cromozomale de structură se iniţiază prin heteroduplexe asincron corectate — fragmentări cu persistenţa

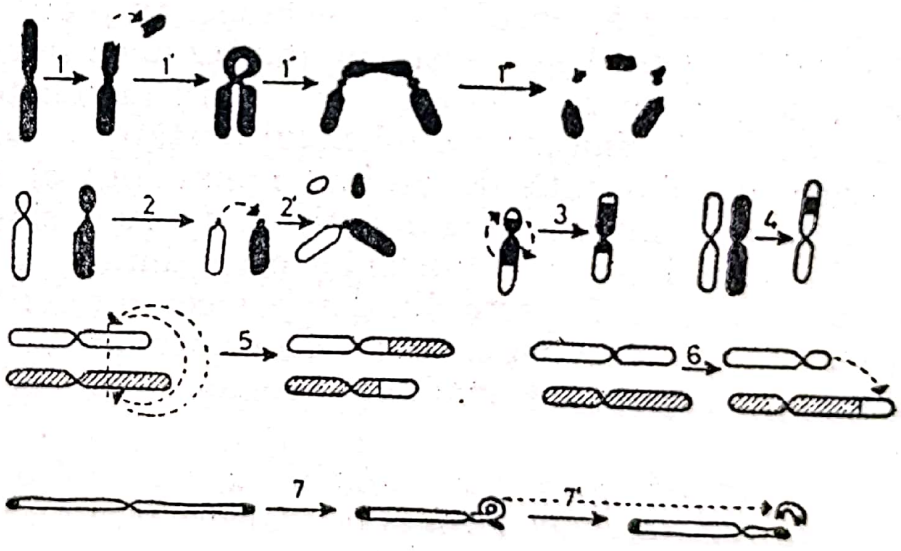


Fig. 89. **Remanierile cromozomice mutaţionale.** 1, 1', 1'' şi 1''' = Mecanismul rupere-fuziune-punte declanşat prin pierderea telomerului şi formarea extremităţii adezive. 2, 2' = fuziunea centrică (translocaţie robertsoniană); 3 = inversia pericentrică. 4 = inserţia. 5 = translocaţie echilibrată, 6 = translocaţie neechilibrată cînd heteroduplexul se rezolvă prin deleţie la cromozomul nehaşurat. 7, 7' = necesitatea fixării telomerului pentru menţinerea unui cromozom deletat; altfel intră în ciclul distructiv rupere-fuziune-punte (1—1'—1''—1''').

Scanned with OKEN Scanner

de extremităţi adezive, migrări de fragmente — şi sfîrşesc prin noi heteroduplexe de reunire în care au loc reparări (excizii nucleotidice, sinteze localizate de ADN, reunire sub efectul ligazei).

Din interpretările moleculare ale remanierilor cromozomale vizibile microscopic reiese clar comunitatea de mecanisme cu cele întîlnite în schimbările punctiforme. Totodată această comunitate de mecanisme deosebite doar prin amploarea segmentelor angajate indică mai pregnant dificultatea de a stabili o graniţă între mutaţii şi recombinări. Astfel se subliniază concepţia modernă că mutaţiile nu pot fi separate la propriu de recombinare iar substituţia terminologică reciprocă mutaţie ⇌ anomalie de recombinare trebuie înţeleasă în complexitatea ei metabolică şi nu în sensul unei erori de cunoaştere. A se considera remanierile cromozomice mari aberaţii de recombinare şi remanierile submicroscopice mutaţii constituie o manieră arbitrară de a diviza într-un mod redundant acelaşi mecanism. Aşa se explică obiceiul clasic prin care se descriau agenţii mutageni separat de agenţii etiologici ai aberaţiilor cromozomice, deşi constituie una şi aceeaşi listă. Termenul de recombinare îşi păstrează autonomia atunci cînd se referă la reasocieri de alele marker situate în afara zonei de heteroduplex din *crossing-over* la care nu se observă schimbări în funcţia genelor urmărite şi care respectă raportul statistic de segregare şi asortare. Acest sens al recombinării stă de fapt la baza cartării genetice (cap. XII).

8. **Progrese în cunoaşterea expresiei genice a mutaţiilor.** Gama proceselor biomoleculare legate de un eveniment mutaţional are trei stadii majore: a) Stadiul fizico-chimic, cu o durată de ordinul femtosecundelor (10^{-15} s), constă fie din leziunea indusă de agentul mutagen, fie din eroarea iniţială a corecturii unui heteroduplex; b) Stadiul molecular, de finisare a duplexului purtător al schimbării de secvenţe bazice, cu o durată de ordinul minutelor; c) Etapa biomoleculară constă atît din expresia fenotipică în succesiunea de generaţii, cît şi din expresia sa evoluţionistă şi are o durată de la ore pînă la perioade multianuale. O parte din datele recente referitoare la primele două stadii au fost descrise mai sus. În continuare se relatează despre progrese în cunoaşterea stadiului biomolecular al evenimentelor mutaţionale.

1. *Expresia genică a mutaţiei.* Baza moleculară a expresiei genice o constituie mecanismul de transfer informaţional ADN→ARN→ proteină în care secvenţa de baze din ADN este codificată prin transcriere în codoni din ARNm iar codonii din ARNm sînt traduşi în secvenţă aminoacidică din proteină (cap. I, IV, VIII). Ca urmare a faptului că mutaţiile schimbă secvenţa de baze din ADN, prin relaţiile de codificare, schimbarea mutaţională este transcrisă în ARNm şi se reflectă şi în schimbarea secvenţei de aminoacizi din polipepti-

Scanned with OKEN Scanner

dele corespunzătoare. În complexul de reacții al expresiei genice, schimbarea secvenței de aminoacizi se reflectă asupra funcțiilor exercitate de proteine și în consecință asupra caracterelor complexe. De aceea, observarea unei schimbări ereditare în metabolismul unui produs neinformațional (lipide, glucide, echilibru hidroelectrolitic etc.) indică un eveniment mutațional petrecut la nivel genomic și investigația de laborator sprijinită pe acest concept teoretic permite rînd pe rînd descoperirea macromoleculelor informaționale încriminate în schimbarea periferică (proteina sau enzima, ARNm corespunzător și gena corespunzătoare). Astfel, schimbările ereditare ale caracterelor complexe reflectă evenimentele mutaționale genice, conform aserțiunii vechilor geneticieni: „fenotipul este oglinda genotipului".

Pentru simplificarea analizei unei mutații, aceasta este adesea studiată izolat, mai ales din necesitatea de a-i preciza substratul molecular de codificare și situarea poziției în genom (cap. XII). Mutațiile însă au loc în ansamblul genomului, pot interesa dimensiuni variabile din genom, sînt localizate în segmente cu funcții variabile (gene de structură, gene de control adaptativ, gene de activare și inactivare, segmente intergenice de organizare a recombinării). Expresia genică a mutației se produce în cadrul interacțiunilor de prelucrare posttranscriptivă și posttraductoare, în interacțiunile complexe ale controlului cantitativ din adaptare și diferențiere, în contextul relațiilor interalelice de dominanță și recesivitate, în ansamblul expresiei genice generale. La dimensiunile subgenice există o multivalență de interacțiuni intragenice reflectate divers în expresia genică.

a) *Mutațiile subgenice și interacțiunile intragenice ale exprimării în transcriere, traducere și în finisarea unei proteine funcționale.* În domeniul expresiei genice schimbările secvențelor de baze se raportează la schimbările secvenței codonice de aminoacizi din lanțurile polipeptidice corespunzătoare. Termenul de codon, conform informației genetice (cap. I), se referă numai la triplete de nucleotide din ARNm, și nu la tripletele corespunzătoare din ADN, deoarece acesta este sursă de informație și nu codificatorul sistemului informațional. Pentru facilitarea explicațiilor moleculare, literatura de specialitate în majoritate nu descrie schimbarea mutațională în termenii tripletelor de baze din ADN, ci în secvențe codonice și aminoacidice.

Schimbările mutaționale de substituție (prin tranziție sau transversie) care interesează o singură bază au drept consecință substituții intercodonice: a) cu același sens, cînd este o substituție de codoni degenerați; b) cu sens eronat, cînd specifică alt aminoacid decît cel inițial; c) nonsens, cînd codonul nou produs nu specifică nici un aminoacid iar în traducere termină precoce sinteza lanțului polipeptidic. Inserția sau deleția unei baze are consecințe drastice asupra citirii (traducerii). Deoarece traducerea este unidirecțională (5′→3′), toți

Scanned with OKEN Scanner

codonii succesivi celui schimbat prin inserție (sau deleție) sînt comutați informațional în coloană (engl. *frameshift*) și produc o secvență aminoacidă total străină față de cea inițială. Amplitudinea schimbării mutaționale în comutarea de coloană codonică depinde de poziția ei în segmentul traductibil; cu cît este mai apropiată de extremitatea 5′, cu atît schimbările sînt mai ample și cu atît lanțul polipeptidic tradus este mai puțin asemănător celui inițial. Mutațiile comutatoare de coloană informațională situate în apropierea extremității 5′ pot fi interpretate ca mutații mute, deoarece expresia genică este atît de străină, încît funcția genică inițială este practic dispărută și poate fi considerată ca genă tăcută (engl. *silent gene*). Detectarea acestei gene ar putea fi numai fizică prin păstrarea distanței în cartarea fină (cap. XII), dar relația funcțională cu gena inițială nu poate fi determinată. Singurele mutații experimentale comutatoare de coloană au fost studiate în cazul lizozimului de bacteriofag și lizozimului albușului de găină. În natură s-au descris variante de HbA umană cu astfel de comutări informaționale. De exemplu, varianta hemoglobinică denumită Hb Wayne are un lanț α în care sînt schimbați ultimii 3 aminoacizi și mai sînt adăugați încă 5 aminoacizi. S-a interpretat că lanțul α Wayne se datorează deleției unei A din codonul Lys^{139}, ceea ce a comutat ultimii trei codoni și funcția terminatoare, găsindu-se un nou terminator doar peste 15 nucleotide în telosegmentul 3′ (cap. VIII).

Și substituțiile codonice prin tranziție sau transversie au consecințe variate în raport cu poziția în segmentul traductibil al ARNm și în segmentele polipeptidice interesate. Mutațiile punctiforme din jurul codonului inițiator au contribuit la demonstrarea complexității sitului de inițiere în sinteza proteinelor (cap. VIII). Nu s-au demonstrat pînă în prezent mutații ale codonului inițiator, în schimb s-au observat mutații care interesează codonii terminatori și care-i fac apți să specifice aminoacizi. De exemplu, varianta de Hb umană Constant Spring este rezultatul unei mutații în gena α^{Hb} care interesează codonul terminator UAA. Prin tranziție acesta devine codon CAA specificator pentru glutamină iar traducerea se continuă în telosegmentul 3′ încorporînd 31 de aminoacizi adiționali pînă cînd întîlnește un codon terminator.

Mutațiile punctiforme de substituție codonică în porțiunea de elongație din traducere au consecințe variate asupra structurii și funcțiilor proteinice în raport cu segmentele polipeptidice interesate: mutații care schimbă structura segmentelor participante la alcătuirea suprafeței moleculei globulare, mutații care vizează segmente precursoare necesare prelucrărilor (telosegmentele polipeptidelor de procolagen, segmentul C proinsulinic); mutații modificatoare ale segmentelor de inflexiune internă în alcătuirea structurii terțiare; mutații substitutive de aminoacizi participanți în alcătuirea situri-

Scanned with OKEN Scanner

lor active sau siturilor cognitive de liganzi alosterici ; mutaţii modificatoare în secvenţa aminoacizilor participanţi în alcătuirea zonelor de contact intersubunitar. Repercusiunile schimbărilor mutaţionale mai depind şi de diferenţele structural funcţionale dintre aminoacizii angajaţi în substituţie : înlocuiri de aminoacizi polari cu aminoacizi amfipatici şi invers sau înlocuiri de aminoacizi aromatici capabili de legături intercalante cu aminoacizi amfipatici ramificaţi şi invers induc obişnuit modificări ; înlocuiri de aminoacizi cu structuri înrudite nu au un răsunet funcţional aparent. Ca urmare, poziţia şi felul aminoacidului înlocuit condiţionează modificările manifestate de proteinele mutant. Substituţiile mutaţionale ale aminoacizilor de suprafaţă cu aminoacizi de sarcină electrică diferită modifică migrarea electroforetică a proteinei şi solubilitatea. Schimbarea aminoacizilor din segmentele siturilor active conduce la modificări în afinitatea faţă de substrat pînă la inactivarea totală fie prin pierderea specificităţii, fie prin legarea prea puternică a substratului. Schimbările de structură internă şi de contact între subunităţi modifică schimbările conformaţionale din tranziţiile alosterice şi influenţează viteza de reacţie cu substratul. Schimbările mutaţionale la nivelul siturilor de liganzi efectori alosterici pot duce la pierderea sensibilităţii pentru liganzi. Schimbările mutaţionale situate în diferite regiuni funcţionale ale proteinei, dar mai ales în regiunile interne şi de contact intersubunitar duc la proteine mutante termosensibile, incapabile să funcţioneze la temperaturi la care proteinele iniţiale au activitate normală. La bacteriofagi, bacterii şi la eucariotele inferioare s-au descris pentru numeroase enzime forme mutante incapabile să-şi exercite activităţile la +42°C iar mutanţii purtători de astfel de proteine sînt numiţi mutanţi ts (engl. *temperature sensitive*) sau condiţionat-letali.

b) *Expresii genice care sînt explicate numai prin remanieri intragenice de crossing-over*. Sînt mutaţii a căror consecinţă constă din deleţia unui segment intragenic echivalent cu unul sau mai mulţi codoni. De exemplu, Hb Gun Hill are un lanţ β căruia îi lipsesc cinci aminoacizi corespunzători la 15 nucleotide. Acest segment se presupune că a fost eliminat printr-un *crossing-over* intragenic urmat de o excizie nucleotidică excesivă. Alte mutaţii au drept consecinţă aberaţii de *crossing-over* care inseră segmente noi genei iniţiale. Un exemplu de inserţie terminală îl constituie structura lanţului β al hemoglobinei Tak. Acest lanţ are ca singură modificare adăugarea unui telosegment carboxiterminal de 10 aminoacili. Primul aminoacil din telosegment este treonina ai cărei codoni (ACU, ACC, ACG, ACA) nu pot deriva din vreun codon terminator printr-un singur eveniment mutaţional. Lang şi Lorkin (1976) propun ca mecanism o inserţie de două nucleotide printr-o recombinare intragenică la extremitatea traductibilă 3′ a genei β înaintea codonului terminator (fig. 90).

Scanned with OKEN Scanner

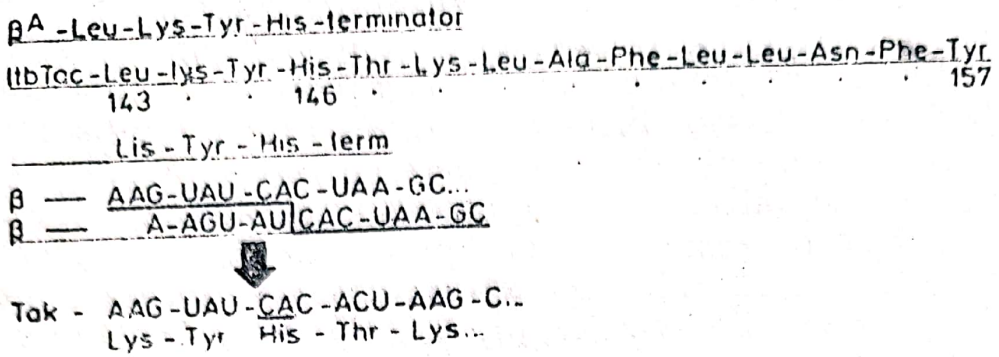


Fig. 90. **Modul de formare a genei Hb Tak prin crossing-over intragenic cu inserție de două nucleotide.** Lanțul β al Hb Tak are un plus de zece aminoacizi adăugat lanțului β normal (sus). Mecanismul de inserție, printr-un *crossing-over* inegal a două nucleotide în plus în gena Hb Tak, ceea ce defazează codonul terminator UAA împărțindu-l între codonii ACU și AAG care specifică Thr și respectiv Lys (vezi tabelul 2, capitolul I) (după Lang și Lorkin, 1976).

Codonul terminator este scos din fază prin această inserție și ARNm este citit pînă se întîlnește un alt terminator.

c) *Relațiile intergenice de crossing-over între gene adiacente sau între alele cu alinieri eronate la nivelul sinapsei moleculare de recombinare.* Secvențierea de aminoacizi ale proteinelor mutaționale a demonstrat existența de erori întinse de recombinare între gene adiacente. Aceste erori de recombinare pot duce la remanieri care să dea naștere la fuziuni genice și la recombinarea lanțurilor polipeptidice corespunzătoare (fig. 91). Un astfel de tip de *crossing-over* cu aliniere eronată în

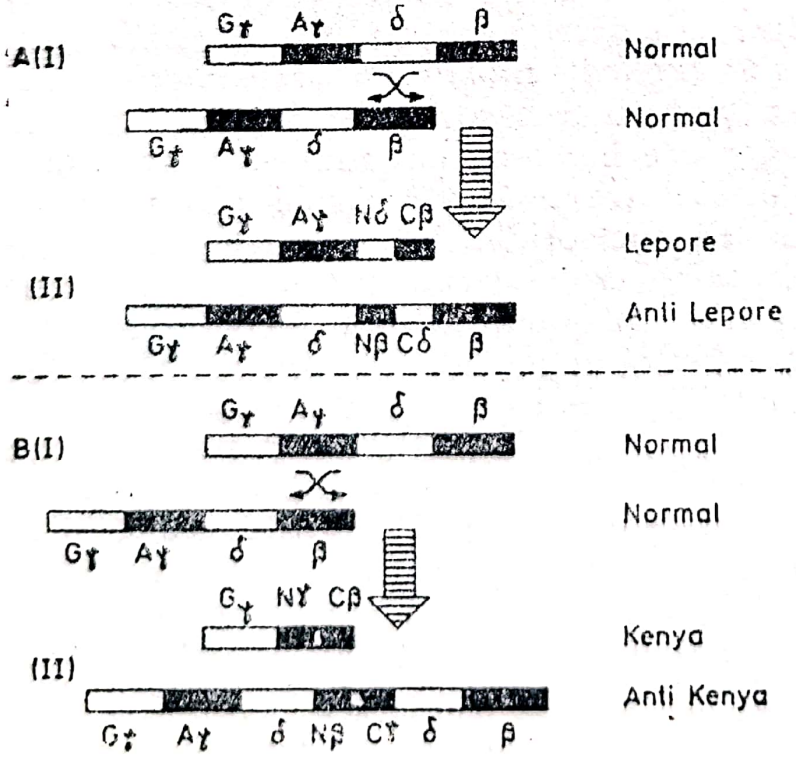


Fig. 91. **Evenimentele de *crossing-over* inegal (paralog) între genele δ și β pe de o parte și genele A_γ și β pe de altă parte.** Acestea au dus la formarea alelelor Lepore și AntiLepore, respectiv a alelelor Kenya și AntiKenya (după Lang și Lorkin, 1976). G_γ = gena codificatoare a lanțului G_γ cu Gly în poziția 136 participant în formarea variantei normale de hemoglobină fetală umană — HbF —; A_γ = gena pentru lanțul A_γ cu Ala în poziția 136 din cealaltă variantă normală a HbF. Datorită lincajului adiacent în cromozomul 2 (sau 11), cît și a homologiilor structurale, heteroduplexele în regiunea lor au condus la sinapse moleculare eronate cu interschimb inegal.

Scanned with OKEN Scanner

sinapsă a fost numit neomolog. Totuși Wu și colab. (1974) susțin că termenul neomolog este eronat pentru interpretarea formării de gene mutant din alinierea eronată a alelelor aceleiași gene, sau din gene adiacente cu strămoș genic comun. Ambele segmente genice angajate în recombinarea mutagenă sînt omoloage. De aceea se propun pentru astfel de evenimente alte denumiri: *crossing-over* ortolog conjugat, cînd inițierea și terminarea interschimbului au loc în interiorul a două gene alele cu aliniere corectă; *crossing-over* ortolog neconjugat, cînd alinierea eronată a două gene alele generează o alelă mutant uneori dublă ca lungime: *crossing-over* paralog, cînd două gene adiacente nealelice, dar genetic omoloage se aliniază eronat și generează alele mutant (fig. 91). Pentru astfel de interschimburi eronate se folosește și termenul mai vechi de *crossing-over* inegal.

d) *Relațiile intergenice ale mutațiilor la nivelul transferului informațional din transcriere și traducere.* Mutațiile genice produc funcțional forme diferite ale genelor inițiale, adică sînt generatoare de alele. În condițiile transferului genetic interbacterian în care o parte din genomul celulei donor (merogenot) se află în celula acceptoare alături de genomul acesteia se creează starea de heterogenot. La eucariotele inferioare și mai ales la cele superioare situațiile în care alelele unei gene se găsesc în aceeași celulă sînt cele mai frecvente. Între alele se stabilesc relații de expresie genică de dominanță și recesivitate sau de expresie genică egală denumită codominanță sau co-expresie. Alelele dominante fie se exprimă la toate organismele la care se găsesc și sînt numite alele cu penetranță completă, fie expresia lor genică este inegal distribuită, la unele organisme dezvoltă expresia lor genică și la altele nu, ipostază denumită penetranță incompletă.

2. *Mecanismele moleculare ale relațiilor dominanță-recesivitate.* Mijloacele tehnice moderne de biochimie în detectarea proteinelor ca produse genice au demonstrat că în majoritatea cazurilor dominanța este parțială, deoarece în condiția heterozigot alelele recesive prezintă expresie genică, dar aceasta este fie cantitativ nesemnificativă pentru îndeplinirea funcției, fie calitatea funcțională este atît de schimbată încît este dominată. Bineînțeles că în cazul mutațiilor drastice care au ca efect apariția de codoni terminatori, comutări informaționale ale coloanei de codoni sau deleția unei alele prin desființarea locusului acesteia alela pereche a unei astfel de schimbări este complet dominantă. Mecanismele incriminate în inegalitatea expresiei genice se referă la diferite nivele ale transferului informațional. Evenimentul mutațional generator al unei alele mutante recesive poate avea ca efect următoarele modificări: scăderea vitezei de transcriere și de prelucrare a ARNm corespunzător; scăderea vitezei de traducere datorită codonilor mutanți care sînt citiți mai lent decît cei inițiali; scăderea vitezei de prelucrare a lanțurilor polipeptidice precursoare; scăderea vitezei de asamblare a lanțurilor polipeptidice

Scanned with OKEN Scanner

în proteina unitară funcțională; diminuarea sau pierderea sensibilității la liganzi conformaționali cu efecte stimulatoare; scăderea vitezei de interacțiune cu cofactori necesari funcțiilor exercitate de proteine; scăderea sensibilității la acțiunea sistemelor generale metabolice (sistemele cAMP, cGMP și prostaglandinele); degradarea mai rapidă a proteinelor alterate prin mutație. La *E.coli* s-a demonstrat, de exemplu, că represorii lac produși de alele mutante ale genei reglatoare sînt degradați de 10 ori mai rapid decît represorii de tip sălbatic. La mamifere s-au observat variante mutaționale de hemoglobină care sînt degradate mai rapid. De pildă, hemoglobina Ann Arbor (rezultată dintr-o substituție în poziția 80 a lanțului α, de tip Leu→Arg) se găsește în concentrații foarte scăzute în condiția heterozigot datorită unui catabolism mai rapid. În realizarea stării de recesivitate intervine fie întregul ansamblu de schimbări ale transferului informațional, fie un număr limitat de modificări, suficiente însă pentru a asigura dominanța alelei pereche în condiția heterozigot. Oricum, relația de dominanță-recesivitate nu are natura unei inhibiții sau represii interalelice, ci o competitivitate independentă în expresia genică, în care alela dominantă are un nivel mai ridicat de funcționare în transferul informațional.

9. **Mutațiile și recombinările ca mecanism principal al evoluției și polimorfismului.** Clasicismul geneticii, întemeiat pe observațiile fenotipice macrostructurale, a conturat punctul de vedere neodarvinist asupra evoluției prin care se afirmă „definitoriu" că forța motrice evoluționistă este constituită de selecția ecologică iar mutația și recombinarea nu sînt decît mecanisme pasive care oferă diversitatea genetică pentru selecția pozitivă darvinistă. În conformitate cu această concepție, față de oportunitatea ecologică mutațiile sînt: neutre, tolerabile, dezavantajoase sau avantajoase. Conform avantajului selectiv, mutațiile funcțiilor stringente oferă variațiile mai propice selecției și implicit evoluției, acestea conferă posibilitățile vaste ale selecției de a dinamiza progresul evoluționist. Mutațiile neutre (indiferente) nu au semnificație evoluționistă, deoarece sînt prin definiție indiferente selecției darviniste de oportunitate ecologică. Cercetările moleculare de mutageneză indusă la nivelul genelor codificatoare de proteine participante în funcțiile stringente (vitale) au avut ca efect însă producerea de mutații dezavantajoase în majoritatea cazurilor. Studiile moleculare comparative ale secvențelor de aminoacizi, secvențierea nucleotidelor din acizii nucleici au permis alcătuirea de arbori filogenetici moleculari pentru lanțuri polipeptidice, pentru proteine și genele corespunzătoare. Astfel de date sugerează din ce în ce mai pregnant incongruența concepției neodarviniste cu nivelul molecular al geneticii (Kimura, 1968; King și Jukes, 1969; Ohta, 1973). Astfel, s-a observat că proteinele care exercită funcții princi-

Scanned with OKEN Scanner

pale, ca și citocromul c, proteinele ribozomale, histona H 4, au mare stabilitate evolutivă, în timp ce fibrinopeptidele A sau B, ale căror funcții sînt secundare, prezintă un număr mare de mutații și polimorfism. La fel, genele ribozomale pentru diferite tipuri de ARNr sînt de mare stabilitate evolutivă, pe cînd ADN spațiator intergenic prezintă schimbări secvențiale semnificativ mult mai mari. În consecință, contrar concepției neodarviniste, cu cît o funcție este mai stringent cerută, cu atît este mai stabilă evolutiv (Kimura și Ohta, 1973). Astfel, diferența de rată evolutivă a diverselor clase moleculare este în principal datorată diferenței în fracțiunea mutațiilor neutre.

Tot cercetările moleculare comparative generează și principiul stabilității evoluționiste prin eliminare letală. Genele codificatoare ale proteinelor cu funcții esențiale au un grad mai mare de stabilitate datorită faptului că o mare fracțiune din schimbările lor mutaționale au fost letale și eliminate din populații fără a avea posibilitatea de fixare funcțională (de exprimare și de transmitere ereditară) în ansamblul organismului. Ca urmare, aceste gene care nu evoluează prin faptul că alelele lor mutaționale sînt eliminate letal și nu pot fi fixate în populație sînt stabile filetic prin eliminări letale și nu printr-o structură moleculară particulară (exemple pentru această aserțiune sînt genele ribozomale și altele). Cu cît o genă este funcțional mai necesară, cu atît este evolutiv mai stabilă și cu atît fixarea mutațiilor sale are probabilități mai mici. Diferențele în capacitatea de fixare a schimbărilor mutaționale variază și între segmentele aceleiași gene. De exemplu, segmentul genic codificator al secvenței aminoacidice care alcătuiește buzunarul hemic este mai stabil evolutiv decît segmentele genice care determină secvențele aminoacidice din alcătuirea suprafeței moleculare a Hb (Kimura și Ohta, 1973).

În cadrul aceleiași molecule de proinsulină s-au calculat 18 schimbări mutaționale, pentru polipeptidul C (cel eliminat din proinsulină în procesul de prelucrare) și numai 1 sau 2 pentru lanțurile A și B participante în structura insulinei. Aceste observații, cît și altele de natură statistică, au condus la concepția că forța motrice a polimorfismului speciației și evoluției o constituie mutațiile și recombinările, și în particular mutațiile și rearanjamentele cromozomice tolerabile care pot fi fixate în succesiunea de generații. Rata mutațională condiționează rata evoluției iar baza moleculară o constituie căile metabolice de mutație și recombinare devenite esențial necesare diviziunii și multiplicării de la organismele cele mai simple pînă la cele superioare. De exemplu, bacteriile deficitare în sistemele de reparare mutațională manifestă grave alterări în diviziune (Kondo, 1974) iar cazurile umane cu hipochiasmata (cu deficiență în *crossing-over* meiotic) sînt sterile, deși potența sexuală nu-i alterată (Hulten, 1974).

Duplicația genică, mutațiile tolerabile și implicațiile evolutive. O potrivire semnificativă cu concepția mutației ca forță motrice a evolu-

Scanned with OKEN Scanner

ției este manifestată de mecanismul duplicației genice. Prin duplicație genică se înțelege adiție de material genetic prin translocație sau conversie, în așa fel că o genă se găsește în doză dublă în același genom. Cu alte cuvinte, duplicația este un eveniment de amplificare limitată a unei gene care se menține apoi în succesiunea de generații. Dacă supradozajul este tolerabil, organismul purtător de duplicație are o genă în plus pentru aceeași funcție. Gena în plus este dispensabilă, deoarece funcția este asigurată de cealaltă genă, iar mutațiile ei sînt tolerabile (neutre). Ultimele se cumulează în succesiunea de generații (engl. *mutation drift*) și la un moment dat gena duplicată (aditivă), a cărei existență a fost independentă și fără influențe funcționale, poate deveni o genă ale cărei produse să fie superioare celor codificate de strămoșul ancestral. Acest mecanism de evoluție cu caracter divergent constituie explicația de bază în apariția evoluționistă a proteinelor oligo- și multimerice cu subunități eterogene codificate de gene separate. De exemplu, hemoglobinele umane cu genele α, β, γ^A, γ^G, ε, ζ (fig 92), imunoglobulinele, lactic-dehidrogenazele și alte proteine cu polimorfism divers.

În concluzie, evoluția are ca forță motrice mutațiile tolerabile (neutre) capabile de cumulări întîmplătoare (engl. *neutral mutation-*

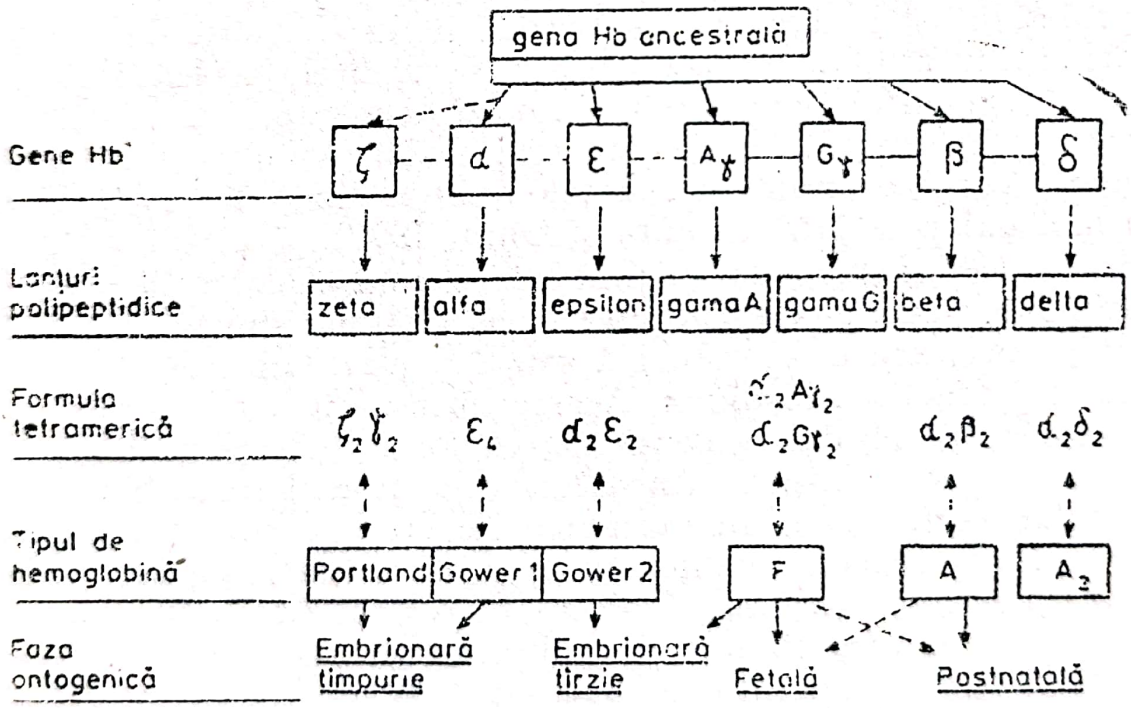


Fig. 92. Duplicațiile genice ilustrate prin genele codificatoare ale polipeptidelor din hemoglobinele umane normale. Expresiile lor genice indicate de săgețile scurte au specificități de etapă ontogenică. Homologiile structurale ale lanțurilor polipeptidice sugerează proveniența genelor corespunzătoare dintr-o genă ancestrală comună, prin procese de duplicație fie în tandem (genele A_γ, G_γ, δ, β), fie prin duplicație translocativă (gena α și gena ancestrală de tip β). Gena ζ codificatoare de lanț zeta pare să fie înrudită cu gena α și posibil în sintenie cu aceasta (capitolul XII).

Scanned with OKEN Scanner

random drift) (Kimura și Ohta, 1973; Ohta, 1974), iar selecția ecologică este un factor de acțiune ulterioară și secundară. Selecția (s) nu amplifică gradul de diversitate a viețuitoarelor și are în acest sens o acțiune negativă, de limitare restrictivă, contrară acțiunii permanente de creștere a diversității (polimorfismului) exercitată de mutații (m) și recombinări (r). Astfel, polimorfismul evolutiv (pf) poate fi formulat prin două funcții:

$$1)\ pf_1 \sim (m + r)^k \quad \text{și} \quad 2)\ pf_2 \sim -s^z,$$

în care k și z sînt exponenți de intensitate a acțiunilor m, r, s.
În consecință, evoluția (E) devine:

$$3)\ E = pf_1 + pf_2 \quad \text{deci} \quad 4)\ E \sim (m + r)^k - s^z,$$

în care $k > z$, în conformitate cu datele lui Kimura și Ohta.
Astfel, pentru $(m + r) = (s)$ rezultă că $(m + r)^k > (s^z)$ sau că efectul evolutiv al mutațiilor și recombinărilor este mai mare decît cel al factorilor selectivi. Concepția fundamentează orientarea aplicativă a domeniilor practice ale biologiei, din care s-ar deduce raportul de investiții care ar trebui să existe în acțiunile de ameliorare. Acțiunea de ameliorare nu este altceva decît forțarea controlată a variabilității speciilor spre amplificarea de caractere economic importante. Privită din acest unghi, manipularea genelor (cap. XIV) realizează într-un timp scurt a amplificare superioară duplicării genice evolutive. Considerînd în scopuri ameliorative formularea de mai sus și comparînd-o cu investițiile efectuate, de exemplu, pentru ameliorarea plantelor de cultură, se constată incongruența de orientare, deoarece investițiile de ameliorare prin creșterea oportunităților ecologice (irigații, prelucrarea terenului cu îngrășăminte, industria producătoare de mașini agricole) sînt incomparabil mai mari decît investițiile pentru studiul mutațiilor, recombinărilor și testarea acestora în teren. Aceste incongruențe au fost făcute peste tot în lume și au avut ca sursă concepția selecției pozitive prin oportunități ecologice ca factor principal al evoluției. Ca urmare, fără a desconsidera oportunitățile ecologice, pentru aplicativitatea biologiei este necesară, cel puțin aparent, o echivalare de investiții pe măsură, nu numai de inteligență creatoare, ci și de posibilități de creație (învățămînt, specializare, aparatură).

10. Mutații germinative și mutații somatice. La organismele multicelulare cu înmulțire gametică-zigotică mutațiile produse la nivelul gameților sînt prezente (prin fecundație și proliferări celulare în ontogeneză) la toate celulele organismului. Aceasta a permis observarea lor timpurie la nivele macrostructurale. Mutațiile însă au loc în toate celulele nucleate ale corpului și în orice perioadă a ontogenezei. Mutațiile din celulele germinative gametogene sînt numite germinative iar cele din celulele care alcătuiesc întregul organism sînt numite

Scanned with OKEN Scanner

somatice. Pe cînd mutațiile germinative au fost studiate în amănunt din perioada clasică a geneticii moleculare, mutațiile somatice, handicapate de absența unei variații fenotipice observabile, au fost studiate mai recent odată cu perfecționarea tehnicilor de urmărire a expresiei genice la nivel microdimensional. Totuși, unele organisme, ca *Delfinium*, au oferit oportunități de observare a mutațiilor somatice, ceea ce a permis lui Demerec (1931) să le definească și să demonstreze că frecvența lor relativă nu este mai scăzută decît a celor germinative. Tehnicile moderne de evidențiere monocelulară și de depistare în masă a defectelor genice au permis studierea evenimentelor mutaționale somatice la nivel celular fie *in vivo*, fie *in vitro* (Sutton, 1974, Vogel și Rathenberg, 1975). Astfel, la hematiile umane s-a demonstrat că mutația pentru gena de persistență a HbF are o frecvență de $2 \times \times 10^{-7}$ pînă la 10^{-5}. *In vitro* s-au putut urmări frecvențele mutațiilor spontane pentru deficiențe enzimatice diverse. Mutațiile somatice sînt de un real interes pentru cunoașterea mecanismelor diferențierii în cazul unor aliniamente celulare necesitînd rearanjamente genice (diferențierea terminală a imunocitelor), cît și în mecanismele îmbătrînirii și mai ales ale malignizării. Mutațiile somatice, atît cele punctiforme cît și cele cu alterări cromozomale vizibile, pot fi o măsură indirectă a evenimentelor mutaționale germinative a căror expresie genică are loc în succesiunea de generații și necesită timp pentru observare. Depistarea mutațiilor somatice în expunerile la agenți mutageni chimici prezintă un real folos pentru populația umană în depistarea efectelor nocive. Un agent mutagen vehiculat pe cale sanguină acționează inegal asupra diferitelor țesuturi și studiul mutațiilor somatice observate la nivel sanguin sau tegumentar nu ar reflecta fidel rata alterărilor mutaționale germinative. S-a observat însă că pentru țesutul testicular există o barieră sanguină la agenți mutageni (Setchell, 1971), ceea ce sugerează că testarea mutațiilor somatice are un grad mai mare de sensibilitate pentru depistarea efectelor nocive, decalajul de fidelitate fiind în favoarea testului. Mutațiile somatice, contrar mutațiilor germinative, nu au un rol semnificativ în variabilitate și evoluție deoarece nu se transmit în genealogia organismelor care le poartă.

11. **Patologia moleculară și mutageneza ecologică.** Patologia moleculară este un domeniu al patologiei generale care se referă la alterările moleculare consecutive mutațiilor genice sau cromozomale fie germinative, fie somatice. Progresele moleculare în studiul cineticii enzimelor au demonstrat că în paralel cu deficiențele majore caracterizate prin entități clinice bine conturate, în populație sînt mai frecvent răspîndite deficite moleculare parțiale a căror exprimare clinică este eterogenă, au concentrări familiale aparent nemendeliene, sînt în general acoperite de interacțiunile multigenice și se exprimă clinic în condiții ecologice de suprasolicitare funcțională. Astfel, pato-

Scanned with OKEN Scanner

logia moleculară dobîndeşte noi valenţe cu potenţial important de investigaţie a bolilor cu largă răspîndire în care metodele statistice ale geneticii au demonstrat participarea de gene alterate. Optimizarea studiilor de enzimologie şi de biochimie a proteinelor în general, îmbunătăţirea tehnicilor de prelevare a biopsiilor de ţesut şi de multiplicare *in vitro* de celule în culturi au permis elucidarea multor defecte enzimatice şi proteinice ereditare (tabelul 13). Defectele ereditare majore se datorează deficienţei în activitatea specifică a unei

Tabelul 13

Enzimopatii ereditare umane cu deficit enzimatic identificat (după McKusik, 1971, cu modificări). Lista de enzimopatii identificate creşte în fiecare an datorită analizelor biochimice ale culturilor de celule derivate din biopsii recoltate de la subiecţii deficitari. Dacă la această listă s-ar adăuga defectele genetice ale proteinelor neenzimatice (hemoglobine, proteine plasmatice, de colagen etc.), atunci numărul defectelor metabolice cunoscute s-ar ridica la peste 400 de entităţi.

No crt.	Boala ereditară	Enzima deficitară
1	— Acatalazia	Catalaza
2	— Deficienţa fosfatazei acide	Fosfataza acidă
3	— Hiperplazia suprarenală I	Steroid-21-hidroxilaza
4	— Hiperplazia suprarenală II	Steroid-11-β-hidroxilaza
5	— Hiperplazia suprarenală III	3-β-hidroxisteroid-dehidrogenaza
6	— Hiperplazia suprarenală IV	Steroid-17-hidroxilaza
7	— Albinism	Tirozinaza
8	— Deficit aldosteronic	Steroid-18-hidroxilaza
9	— Alcaptonuria	Homogentizic acid-sintetaza
10	— Angiokeratomul difuz (Fabry)	Ceramid-trihexozidaza
11	— Apnee indusă de relaxanţi	Pseudocolin-esteraza
12	— Argininemia	Arginaza
13	— Argininosuccinic-acidemia	Argininosuccinaza
14	— Aspartil-glicozaminuria	Hidrolaza specifică
15	— Ataxia piruvicacidemică	Piruvat-decarboxilaza
16	— Carnozinemia	Carnozinaza
17	— Deficienţa în ester de colesterol (Norum)	Lecitin-colesterolacetil-transferaza
18	— Sindromul Crigler-Najjar	Glucuronil-transferaza
19	— Citrulinemia	Argininosuccinic acid-sintetaza
20	— Cistationinuria	Cistationinaza
21	— Intoleranţa la dizaharide I	Invertaza
22	— Intoleranţa la dizaharide II	Invertaza, maltaza
23	— Intoleranţa la dizaharide III	Lactaza
24	— Deficienţa formiminotransferazică	Formiminotransferaza
25	— Intoleranţa la fructoză	Fructozo-1-fosfat-aldolaza
26	— Fructozuria	Fructokinaza hepatică
27	— Fucozidoza	Fucozidaza
28	— Deficienţa în galactokinază	Galactokinaza
29	— Galactozemia	Galactoza-1-fosfat uridil-transferaza
30	— Gangliozidoza g-ralizată	β-galactozidaza
31	— Boala Gaucher	Glucocerebrozidaza
32	— Boala Farber (ceramidoza)	Ceramidaza

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 13 (continuare)

No crt.	Boala ereditară	Enzima deficitară
33	— Leucodistrofia metacromatică (sulfatidoza varianta B)	Cerebrozid-sulfataza (aril-sulfataza A)
34	— Leucodistrofia metacromatică (sulfatidoza tip O)	Aril-sulfatazele tip A, B, C şi steroidică
35	— Lactozil-ceramidoza	Lactozil-ceramid-β-galactozidaza
36	— Boala Tay-Sachs (gangliozidoza GM_2 varianta B)	N-acetil-β-D-hexozaminidaza A
37	— Boala Sandhoff (gangliozidoza GM_2 varianta O)	N-acetil-β-D-hexozaminidaza A, B
38	— Deficienţa G6PD(favism)	Glucoza-6-fosfat dehidrogenaza
39	— Glicogenoza tip I	Glucoza-6-fosfataza
40	— Glicogenoza tip II	α-1-4-glucozidaza
41	— Glicogenoza tip III	Amilo-1-6-glucozidaza
42	— Glicogenoza tip IV	Amilo-(1-4 la 1-6)-transglucozidaza
43	— Glicogenoza tip V	Fosforilaza musculară
44	— Glicogenoza tip VI	Fosforilaza hepatică
45	— Glicogenoza tip VII	Fosfofructokinaza musculară
46	— Glicogenoza tip VIII	Fosforilazo-kinaza hepatică
47	— Guta primară HGPRT	Hipoxantin guanin fosforibozil-transferaza
48	— Anemia hemolitică ATP-azică	Adenozin-trifosfataza
49	— Anemia hemolitică adenil-kinazică	Adenilat-kinaza
50	— Anemia hemolitică difosfoglicerică	Difosfoglicerat-kinaza
51	— Anemia hemolitică	Glutation-reductaza
52	— Anemia hemolitică	Glutation-sintetaza
53	— Anemia hemolitică hexokinazică	Hexokinaza
54	— Anemia h-litică	Hexozofosfat-izomeraza
55	— Anemia h-litică	Fosfoglicerat-kinaza
56	— Anemia h-litică	Piruvat-kinaza
57	— Anemia h-litică	Triozofosfat-izomeraza
58	— Histidinemia	Histidaza
59	— Homocistinuria	Cistationin-sintetaza
60	— Sindromul Hurler	α-L-iduronidaza
61	— Sindromul Hunter	Sulfoiduronat-sintetaza
62	— Sindromul Sanfilippo (acumulare de heparan sulfat)	— Heparin, heparan-N-sulfataza
63	— β,β′-hidroxivaleric-aciduria	— β-metil crotonil CoA-carboxilaza
64	— metilcrotonilizinuria	Idem
65	— Hidroxiprolinemia	Hidroxiprolin-oxidaza
66	— Hiperamonemia I	Ornitin-transcarbamilaza
67	— Hiperamonemia II	Carbamilfosfat-sintetaza
68	— Hiperglicinemia forma cetonică	Propionat-carboxilaza
69	— Hiperlizinemia	Lizin cetoglutarat reductaza
70	— Hiperoxaluria I glicolic-aciduria	2-oxo-glutarat-glioxilat-carboligaza
71	— Gliceric-aciduria	D-gliceric-dehidrogenaza
72	— Hiperprolinemia I	Prolin-oxidaza
73	— Hiperprolinemia II	— δ-1-prolin-5-carboxilat-dehidrogenaza
74	— Hipoglicemia acidotică	Fructozo-1-6-difosfataza
75	— Hipofosfatazia	Fosfataza alcalină
76	— Deficienţa în lactaza intestinală la adult	Lactaza tardivă

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 13 (continuare)

No crt.	Boala ereditară	Enzima deficitară
77	— Izovaleric acidemia	Izovaleric acid-CoA-dehidrogenaza
78	— Boala Krabbe (galactocerebrozidaza)	Galactocerebrozid-β-galactozidaza
79	— Encefalomielopatia necrotică Leigh	Piruvat-carboxilaza
80	— Deficienţa în lipază	Lipaza pancreatică
81	— Intoleranţa la lizină	L-lizin : NAD-oxido-reductaza
82	— Manozidoza	— α-manozidaza
83	— Hiperaminacidemia amino-acizilor ramificaţi	— α-ceto acid decarboxilaza
84	— Methemoglobinemia	NAD-methemoglobin-reductaza
85	— Metil malonic aciduria I	Metil malonic-CoA-carboxilaza
86	— Metil malonic aciduria II	Metil malonic-CoA-izomeraza
87	— Deficienţa în mieloperoxidază	Mieloperoxidaza
88	— Icter neonatal	Glutation-peroxidaza
89	— Boala Niemann-Pick (sfingomielinoză)	Sfingomielinaza
90	— Orotic aciduria	Orotidil-pirofosforilaza şi orotidil-decarboxilaza
91	— Fenil cetonuria	Fenilalanin-hidroxilaza
92	— Porfiria congenitală	Uroporfirinogen III
93	— Propionic acidemia	Propionil-CoA-carboxilaza
94	— Emfizem pulmonar	— α-1-antitripsina
95	— Convulsii infantile piridoxin dependente	Glutamic-acid-decarboxilaza
96	— Anemia familială piridoxin dependentă	— δ-aminolevulinic acid-sintetaza
97	— Boala Refsum	Fitanic acid-oxidaza
98	— Deficienţa în sulfitoxidază	Sulfit-oxidaza
99	— Anemia megaloblastică dependentă de vitamina B_{12}	Trans cobalamin II
100	— Testicul feminizant	Steron-Δ 4-5-α-reductaza
101	— Deficit în hormonogeneza tiroidiană	Iodotirozin-dehalogenaza
102	— Deficienţa în tripsinogen	Tripsinogen
103	— Tirozinemia I	Parahidroxifenil piruvat-oxidaza
104	— Tirozinemia II	Tirozin-transaminaza
105	— Valinemia	Valin-transaminaza
106	— Rahitism rezistent la vitamina D	Colecalciferaza
107	— Boala Wolman	Lipaza acidă
108	— Xantinuria	Xantin-oxidaza
109	— Xanturenic aciduria	Kinureninaza
110	— Xeroderma pigmentosum I	Endonucleaza UV specifică
111	— Xeroderma pigmentosum II	Deficienţa în reparare postreplicativă
112	— Deficienţa în xilozidază	Xilozidaza

enzime sau altei proteine a cărei participare este esenţială pentru în deplinirea funcţiei sau funcţiilor alterate în starea clinică în observare. Deficienţa activităţii enzimatice are ca mecanism alterarea mutaţională a genei care codifică enzima interesată. Deficienţa totală enzimatică poate fi provocată fie de o mutaţie nonsens în interiorul

Scanned with OKEN Scanner

genei corespunzătoare care duce la sinteza de lanțuri polipeptidice incomplete, fie de mutații cu comutare de sens informațional, fie de deleția totală a genei, fie de alterarea segmentului genic corespunzător sitului activ. Îmbunătățirea metodelor de observație a activităților enzimatice a demonstrat însă că în numeroase cazuri există nivele variabile ale activității enzimatice deficitare și că deseori bolile genetice nu sînt manifestări de tip „tot sau nimic".

1. *Eterogeneitatea bolilor ereditare și deficitul enzimatic parțial.* Eterogenitatea deficitului metabolic într-o boală ereditară se datorează următorilor factori: a) poziția și felul evenimentului mutațional în gena afectată; b) cointeresarea mai multor gene în codificarea și finisarea aceleiași proteine; c) ansamblul genotipic al organismului în care se exprimă alela patologică; d) condițiile ecologice ale subiectului afectat. Afectarea sitului activ provoacă o deficiență majoră pînă la inactivitate totală. Afectarea celorlalte segmente însă poate avea ca rezultat pierderea parțială a activității enzimei sau proteinei corespunzătoare. De exemplu, s-au observat hiperfenilalaninemii familiale fără fenilcetonurie. Acestea sînt mult mai frecvente decît defectul major fenilcetonuric. La fel s-a observat o variantă mutațională „Duarte" a galactozo-1-fosfat uridiltransferazei caracterizată printr-un deficit parțial care scade pînă la 50% activitatea enzimatică. Alela codificatoare a enzimei Duarte nu produce nici în condiția homozigot perturbări ale sindromului galactozemic. Deficite parțiale au fost observate în corelație și cu alte deficiențe majore din diferite boli ereditare cu defect metabolic cunoscut. Defectele genetice parțiale corelate cu participarea multigenică în finisarea proteinelor funcționale și cu ansamblul genotipic tind să explice baza moleculară a afecțiunilor poligenice și a modului de realizare, în ansamblul fenotipului, a caracterelor poligenice.

2. *Bolile poligenice pot fi datorate unor alterări monogenice parțiale decompensate.* S-a observat că unele deficiențe metabolice care în perioada antecedentă studiului molecular erau etichetate ca poligenice s-au dovedit a fi datorate alterărilor monogenice parțiale ale proteinelor implicate în defectul metabolic. Din numeroase exemple care pot fi relatate se reliefează hiperuricemia cu hiperuricurie și sindromul gutei datorat cristalizărilor de urat monosodic în humorile suprasaturate în acid uric din organism. Cristalele de urați se depun cu predilecție în membranele sinoviale ale articulațiilor, burselor și tecilor tendinoase provocînd dureri reumatoide, uneori de mare dramatism. În 25% din cazuri apar calculi urinari și adesea depuneri de urați, interstițial, în parenchimul renal. Studiile statistice de genetică populațională și familială aduceau argumente pentru o boală poligenică. Cercetările moleculare însă au demonstrat că sindromul gutei poate fi realizat de deficite parțiale ale enzimelor implicate în metabolizarea nucleotidelor purinice (bazele purinice și derivații

Scanned with OKEN Scanner

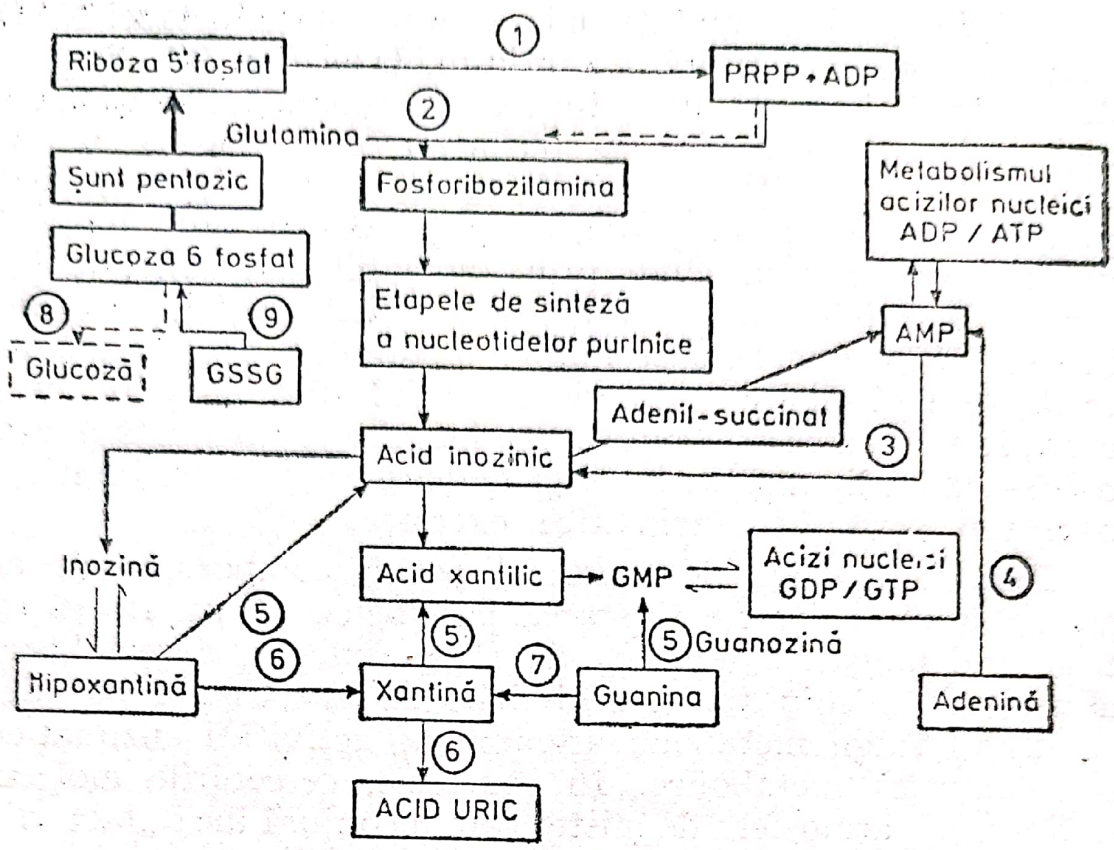


Fig. 93. **Etapele metabolice ale nucleotidelor purinice în care alterări mutaționale ale genelor pentru enzimele implicate direct sau indirect în aceste căi duc fie la insuficiențe parțiale, fie la activități excesive generatoare ale hiperuricemiei și sindromului gutos** (după Watts, 1974, cu modificări), PRPP = 5′—fosforibozil-1′-pirofosfat. 1 = PRPP-sintetază. 2 = glutamin-PRPP-amidotransferază (pierderea sensibilității pentru inhibiție *feed-back*). 3 = AMP-dezaminaza. 4 = Adenin fosforibozil-transferaza (APRT). 5 = hipoxantin-guanozin-fosforibozil-transferaza (HGPRT). 6 = xantin oxidaza. 7 = guanin-dezaminaza. 8 = glucozo-6-fosfataza. 9 = glutation-reductaza.

fosforilați ai ribozei: riboza 5′ fosfat și fosforibozil pirofosfat). S-a observat că peste 1% din cazurile de gută se datorează unei deficiențe parțiale în enzima hipoxantin-guanozin fosforibozil-transferază (HGPRT) în care se pune în evidență persistența a 0,1—1% din activitatea normală (fig. 93—5). În alte cazuri de gută a fost observată creșterea anormală a activității PRPP-sintetazei care provoacă un exces de sinteză a acidului și duce la hiperuricemie. Excesul de sinteză purinică este indus prin cantitatea mare de PRPP care are efect alosteric pozitiv asupra primei enzime din calea sintezei nucleotidelor purinice (fig. 93—1). Hiperuricemie gutoasă a fost observată și în deficiențele parțiale sau totale de glucoză-6-fosfatază (în care se realizează și glicogenoza tip I — tabelul 13). În aceste cazuri hiperuricemia se datorează unui șir de interacțiuni: excesul de glucozo-6-fosfat este metabolizat pe calea pentozo-fosfat, ceea ce conduce la exces de riboză 5′-fosfat și implicit la creșterea PRPP; PRPP stimulează sinteza purinelor în exces care în final conduce la hiperuricemie. Această creștere a PRPP urmată de sinteză excesivă de purine este

Scanned with OKEN Scanner

dată și de creșterea mutațională a glutation-reductazei NADP dependente. Creșterea activității xantin-oxidazei (fig. 93—6) prin mutații, demonstrată la grupe de gutoși, cît și anomalii mutaționale ale enzimei reglatoare din sinteza purinelor care duc la insensibilitatea acesteia la inhibiția *feed-back* cresc numărul de deficite genice producătoare de gută. Astfel, cel puțin 8 gene sînt implicate în producerea sindromului gutei prin anomaliile lor funcționale mutaționale fie de scădere a activității prin deficit parțial, fie prin activități în exces care duc la dezechilibre metabolice de interacțiune. Astfel, analizele moleculare profunde ale unui sindrom care cu 15 ani în urmă se spunea că este multifactorial cu o componentă genetică variabilă s-a dovedit a avea la bază deficite parțiale enzimatice mutaționale sau activități enzimatice excesive.

Deficite parțiale de acest fel pot fi compensate de activitățile ansamblului enzimatic și starea patologică să nu fie exprimată un timp îndelungat. Condițiile de stres (infecții, dezechilibre excesive alimentare, mediu toxic, schimbări de bioritmuri) pot decompensa echilibrul fragil metabolic asigurat de activități enzimatice parțiale sau comutări metabolice. În concluzie, cercetările moleculare tind să destrame atmosfera de mister care înconjură încă „factorii genetici" sau „componenta genetică" în patologie și să precizeze, printr-o „disecție" metabolică riguroasă a acestei componente, alterările moleculare care o realizează.

3. *Mutageneza ecologică și alți factori care conturează cauzalitatea patologiei moleculare.* Cercetările clasice de mutageneză au demonstrat capacitatea mutagenă a numeroși agenți fizici, chimici și biologici. Pentru patologia moleculară sînt însă importanți o serie de agenți mutageni fizici, chimici și biologici care fac parte din mediul ambiant și implicit participă la alcătuirea ecosistemului în care viețuiește și populația umană. O mare parte dintre acești agenți mutageni sînt produse ale industrializării și modernizării sociale a condițiilor de viață. Alături de acțiunea mutagenă cunoscută a radiațiilor X și a celor ionizante, studiul experimental prin teste de mutageneză a demonstrat că numeroase produse chimice răspîndite în ecosistemul uman modern au efecte indubitabil mutagene (creșterea frecvenței mutațiilor la bacterii și animale de laborator, aberații cromozomale la celule umane în cultură). Aceste constatări, revelatoare pentru pericolul unor creșteri amenințătoare a alterărilor mutaționale și a numărului de handicapați genetic, au condus la dezvoltarea organizată a unui nou domeniu denumit mutageneză ecologică sau mutageneză de mediu (engl. *environmental mutagenesis*). Agenții mutageni ecologici sînt implicați cu precădere în prejudiciile genetice care le pot aduce speciei umane și își au originea în patru căi principale de răspîndire în mediu: calea de combatere a dăunătorilor agricoli prin pesticide; calea poluărilor industriale cu factori nocivi dovediți ca

Scanned with OKEN Scanner

fiind mutageni (izotopi radioactivi, oxizi de azot, derivați alchilanți, nitro-derivați); calea alimentară, prin produse conservante încorporate în alimente; calea iatrogenă caracterizată prin utilizarea irațională a radiațiilor X și izotopilor radioactivi în scop diagnostic și terapeutic cît și prin introducerea de noi medicamente care pot fi și mutagene potente. O parte dintre acești mutageni sînt compuși chimici care, pe lîngă calitățile lor utilitare, pot avea efecte alterante asupra materialului genetic. Cele mai importante grupări funcționale cu potențial mutagen sînt: grupările alchil activate din compușii organofosforici sau organohalogenați, inele aromatice eterociclice analoage bazelor purinice și pirimidinice, grupele nitro, amina, nitrozo și hidrazinice. Introducerea unor astfel de grupări funcționale în compuși chimici mai vechi crește acțiunea utilitară (medicamentoasă, pesticidă, conservantă etc.), dar totodată poate să amplifice afinitatea pentru ADN și implicit efectele mutaționale.

Condițiile biologice mutagene care pot fi luate în considerație în conexiune cu mutageneza ecologică sînt infecțiile virale, infestarea alimentară cu fungi și subnutriția. Mecanismele moleculare unitare ale mutației și recombinării, cît și studiul relațiilor dintre genoamele virale și cromozomii celulelor gazdă îndreptățesc concepția că virusurile induc alterări mutaționale. Virusurile ARN din familia Retraviridae capabile de transformări tumorale la animale prin mecanismul transcrierii inverse integrează segmentul de ADN complementar în genomul celulelor de eucariote animale unde induc alterări soldate cu mutații somatice maligne. Unele virusuri ADN din familia Papova (virusurile polioma) sînt clasic descrise ca inductoare de transformări maligne iar virusul simian 40 (SV 40) izolat de la maimuțe s-a dovedit capabil să transforme malign celule umane cultivate *in vitro*. Mai importante pentru organismele umane sînt efectele maligne provocate de virusuri ADN izolate de la om, dintre care tipul de adenovirus 12 și mai ales virusurile herpetice de tip Epstein-Barr (virusurile EB). Numeroase studii moleculare au demonstrat că în procesul de transformare malignă genoamele virale se integrează în cromozomii umani printr-un proces de recombinare liniară covalentă demonstrîndu-se situri particulare de integrare, analoage celor demonstrate pentru bacteriofagii lizogeni (cap. XII).

Infestările alimentelor cu fungi producătoare de toxine mutagene sînt exemplificate mai ales prin speciile de *Aspergillus* (sp. *flavus*) producătoare de aflatoxine. Aflatoxina B 1, responsabilă pentru frecvența mare de cancer hepatic în țările limitrofe oceanului Indian, s-a dovedit a fi un mutagen potent. Acest agent are afinitate pentru resturile guaninice din ADN și formează legături transverse de tip alchilic care nu pot fi eliminate decît prin excizie și reparare recombinativă.

Scanned with OKEN Scanner

Sînt date care pledează pentru o creștere a aberațiilor cromozomale în condiții de malnutriție a populației umane. Aceasta s-ar explica molecular prin scăderea nivelului de nucleotide precursoare necesare sintezei de ADN atît datorită aportului nutritiv scăzut, cît și reducerii în sinteza *de novo* a acestor nucleotide. Nivelul scăzut de nucleotide ar produce erori de reparare și de replicare. Experimental s-a dovedit că mutanții bacterieni dependenți de timină prezintă alterări grave de replicare și fragmentări de ADN cînd cantitatea de timină din mediu este scăzută. Acest fenomen, denumit moarte prin mai puțină timină (engl. *thymineless death*), a fost observat și la celule eucariote cultivate *in vitro*.

4. *Patogenia defectelor genetice*. Deși există o diversitate enormă a entităților clinice dovedite ca fiind defecte genetice, diversitatea lor izvorăște din varietatea genelor și regiunilor genetice interesate și nu din patogenia alterărilor genomice. Această patogenie este unitară și constă dintr-o supraîncărcare a căilor constitutive de reparare și din inducția sistemelor reparatoare predispuse la erori. Mecanismele biochimice ale replicării, transcrierii, reparării și recombinării indică nivelul ridicat de activitate a ADN în relație cu participarea fiziologică a endonucleazelor, ligazelor, enzimelor destabilizatoare, proteine translocatoare, factori comuni acestor procese și ubicuitar răspîndite (cap. III și IV). Metabolismul ADN și enzimele lui mai indică existența fiziologică a unui fond permanent de ruperi și reuniri ale moleculelor lungi de ADN, produse de endonucleaze și respectiv de ligaze. Ruperile endonucleazice și reunirile ligazice cuplate cu intervențiile eventuale ale exonucleazelor reparatorii se află într-un echilibru fiziologic. Intervenția unui agent mutagen ecologic în acest echilibru dinamic provoacă fie o creștere a ruperilor, fie apariția de leziuni incompatibile cu desfășurarea proceselor de replicare și transcriere. Mulțimea de ruperi adăugată fondului fiziologic depășește capacitatea ligazei de a reface ruperile într-o succesiune rapidă; rezultă fragmente în exces care solicită sistemele constitutive de reparare. Excesul de ruperi provoacă structuri heteroduplex, extremități adezive, migrări de segmente. Intîrzierile de reparare produc asocieri la întîmplare de fragmente eteroloage cu mici omologii secvențiale oferite de segmentele repetitive și de structuri cruciforme de tip Gierer. Fie prezența mutagenului, fie leziunile provocate la nivelul ADN, fie întîrzierea reparărilor induc sistemul de reparare predispus la erori care amplifică reparările eronate și conduc la inversii, translocații, deleții, declanșări ale mecanismului rupere-fuziune-punte. Aceste mecanisme corespunzătoare fazelor fizico-chimică și biomoleculară ale acțiunii unui mutagen sînt urmate de consecințe patologice a căror manifestare depinde de etapa ontogenetică în care se află celulele prejudiciate. 1) În etapa prezigotică, la nivelul celulelor germinative provoacă defectele genice transmisibile ereditar sau aberațiile cromozomale de număr și struc-

Scanned with OKEN Scanner

tură. Efectelor de la acest nivel li se rezervă noțiunea de mutații iar factorilor generatori, denumirile de mutageni. 2) Producerea lor în etapa embrionară la nivelul celulelor primordiale inițiatoare de aliniamente de diferențiere provoacă fie apariția de mozaicisme cromozomale, fie moartea celulelor primordiale urmate de disgenezii în organogeneză, fie blocarea specializării (dizembrioame). Datorită acestui efect, agenții mutageni sînt numiți acum teratogeni (gr. *teraton* = monstruozitate). Teratogeneza poate fi provocată și de alți factori care perturbă dezvoltarea embrionară prin leziuni negenetice (infecții transplacentare cu virusuri neoncogene, infecția treponemică, infestarea toxoplasmică, talidomida). Aceștia din urmă sînt numai teratogeni și niciodată mutageni. În schimb, toți agenții mutageni s-au dovedit și teratogeni. 3) Acțiunea mutagenilor asupra celulelor somatice cu diferențiere terminală se soldează adesea cu mutații somatice maligne (oncogene) iar în această ipostază agenții mutageni sînt cancerigeni. Astfel, cancerul este privit în prezent ca o boală genetică a celulelor somatice în care leziunea inițială oncogenă vizează o singură celulă sau un grup limitat de celule (Legator și Flamm, 1973, Levan și colab., 1977). Leziunile inițiale sînt submicroscopice, asemănătoare alterărilor în reparările moleculare. Acestea atrag după sine amplificări prin inducția sistemului de reparări predispus la erori care duc la remanieri cromozomice progresiv mai ample pînă la starea malignă drastică. În conformitate cu întrepătrunderea dintre fenomenele mutaționale și cele ale recombinării, în genetică se manifestă tendința unificării mecanismelor de oncogeneză virală, oncogeneză chimică și oncogeneză cu agenți fizici. Malignizarea în concepția genetică este polietiologică monopatogenă, afectează celulele somatice și cuprinde un eveniment sau evenimente de mutație somatică. Unul din argumentele principale ale concepției genetice în oncogeneză a constat din faptul că agenții mutageni sînt și carcinogeni și invers, orice agent carcinogen este și mutagen. Dificultatea majoră a ipotezei genetice a constat din neîncadrarea virusurilor tumorale într-un consens cu acțiunea agenților carcinogeni fizici și chimici. Descoperirea mecanismului de recombinare integrativă la originea transformării maligne virale, efectele mutagene ale acestor recombinări asupra celulelor gazdă determină ca și efectul oncogen al virusurilor tumorale să devină un argument în sprijinul concepției genetice asupra malignizării.

În concluzie, rezultă că mutageneza ecologică este implicată în etiopatiogenia bolilor genetice, în patogenia teratologică și în patogenia cancerului. Această concepție a incitat un interes major în controlul fondului ecologic mutagen existent și în limitarea acestuia printr-o verificare riguroasă a eventualului potențial mutagen pe care l-ar putea avea noile produse (medicamente, pesticide, conservante alimentare) destinate utilizării lor social-economice. Verificarea poten-

Scanned with OKEN Scanner

ţialului mutagen se efectuează printr-o serie de teste în care bacteriile, virusurile, celulele umane cultivate *in vitro* sau animalele de experienţă sînt expuse la produsul de controlat studiindu-se apoi eventualele efecte mutagene.

12. Mutaţiile ca producătoare de alelism şi implicit furnizoare de markeri genetici. S-a mai subliniat că majoritatea mutaţiilor care supravieţuiesc nu sînt însoţite de alterări mari ale genomului. Adesea mutaţiile sînt punctiforme şi schimbă funcţia genei fără a modifica poziţia acesteia în genom. Printr-un astfel de eveniment mutaţional are loc producerea unei noi forme a aceleiaşi gene care codifică un lanţ polipeptidic asemănător, dar neidentic celui codificat de gena de origine. Astfel, mutaţiile sînt generatoare de alele. Din acest mecanism molecular rezultă mai clar caracterul definitoriu al alelelor: forme diferite ale unei gene care ocupă aceeaşi poziţie în genom sau acelaşi locus (capitolul XII). Conform definiţiei genetice a omologiei, alelele unei gene sînt totodată şi structuri genetice omoloage, deoarece au o origine comună (strămoş genetic comun). Cromozomii unei perechi omoloage de la organismele sexuate sînt în ansamblu alelici, deşi multe din genele care-i compun pot fi identice (condiţia homozigot). În ansamblul natural al populaţiei unei specii majoritatea genelor cercetate prezintă diversitate alelică şi ca urmare gena poate fi considerată ca o noţiune abstractă materializată în natură prin alelele sale iar noţiunea de locus rămîne o noţiune concretă, fiind poziţia ocupată de alelele diferite ale aceleiaşi gene. De aceea în analiza genetică se întîlneşte din ce în ce mai frecvent referirea codificării unui caracter la locus şi nu la gena corespunzătoare; de exemplu, locusul *A* care codifică polipeptidul A.

Schimbările mutaţionale intragenice teoretic posibile, raportate la secvenţa de baze a unei gene, sugerează potenţialul mare al acesteia de a genera alele diferite. De exemplu, dacă se consideră un locus genic format din 900 de perechi nucleotidice codificator al unui lanţ polipeptidic de 300 de aminoacizi, atunci acest locus poate avea, numai prin mutaţii punctiforme de substituţie nucleotidică, 2700 de alele diferite (Harris, 1974). Acest raţionament se bazează pe considerentul că fiecare bază nucleică poate fi schimbată cu una din celelalte trei posibile (de exemplu, A poate fi schimbată fie cu T, fie cu C, fie cu G; T poate fi schimbată fie cu A, fie cu C, fie cu G etc.). Potenţialul alelogen referit la un locus este cu mult mai mare din cel puţin două motive: alelele existente au probabilitatea egală de a avea evenimente mutaţionale succesive în alte situri decît cel original; mutaţiile intragenice nu sînt numai de tipul substituţiilor nucleotidice, ci pot fi şi inserţii, deleţii, inversii, fiecare din acestea de întinderi variabile (de exemplu, inserţie punctiformă sau inserţii de două, trei sau mai multe baze). Ca urmare a posibilităţilor de a exista inserţii, deleţii

Scanned with OKEN Scanner

sau substituții ale tripletelor pentru codonii terminatori care-i fac din codoni nonsens, codoni cu sens, mutațiile pot modifica și întinderea locusului genic: să-l scurteze sau să-l alungească prin oricare dintre schimbările nucleotidice bazale. Conform potențialului alelogen, în măsura în care nu acționează mecanismul eliminării letale, fiecare locus genic prezintă alelism multiplu, adică în populația unei specii există mai multe alele ale aceluiași locus reflectate în polimorfismul fenotipic al proteinelor sau polipeptidelor codificate de diferitele alele. Un exemplu edificator îl constituie alelismul multiplu al locilor α și β codificatori ai lanțurilor polipeptidice din hemoglobina umană A.

Schimbarea mutațională generatoare a unei alele este marcată de schimbarea expresiei genice, motiv pentru care markerii genetici au fost definiți la început ca mutații care marchează existența unei gene date (Goodenough și Levine, 1974). Markerul genetic mai este înțeles ca diferența de expresie genică dintre alelele unui locus, diferență care permite urmărirea transmisiei ereditare, procesele de segregare și asortare care însoțesc recombinările genice în succesiunea de generații. În marea majoritate a cazurilor, diferențele marker se referă la diferențele de expresie genică, motiv pentru care atît prima, cît și a doua definiție a markerului genetic arată că markerul nu este o genă sau o alelă, ci un indicator al unui locus genic sau al unei alele. Deoarece denumirea unei alele este adesea simbolizată după numele markerului corespunzător, atunci și alela este considerată marker. În nomenclatura scriptică, pentru a le deosebi, s-a convenit ca denumirea alelei să fie notată cu scriere cursivă iar denumirea markerului cu scrierea obișnuită. La aceste simboluri se adaugă și alte prefixe, sufixe și supranotări care indică diferența funcțională considerată marker. Un progres deosebit a fost furnizat de stabilirea și delimitarea markerilor genetici moleculari în conformitate cu principiul central al corespondenței definitorii o genă — un lanț polipeptidic. Pe baza acestui principiu, orice schimbare funcțională transmisibilă ereditar a unei proteine constituie un marker. Ultimul este punctul de plecare al unei analize genetice, deoarece schimbarea ereditară a activității unei proteine (absența, deficiența parțială, excesul de activitate) indică indubitabil modificarea mutațională a secvenței de aminoacizi din constituția ei.

În același context se pot preciza modurile de abordare a genelor în studii moleculare: 1) depistarea de schimbări metabolice ereditare (deficiența sau excesul de sinteză a metaboliților bazali — aminoacizi, nucleotide, glucide, lipide, schimbări în distribuția electroliților); 2) identificarea proteinei (enzimei) modificate; 3) identificarea lanțului polipeptidic schimbat stabilindu-se markerul molecular al genei investigate; 4) cercetarea relațiilor de exprimare fenotipică, genealogice, populaționale și filetice; 5) studiul interacțiunilor funcționale

Scanned with OKEN Scanner

în expresia genică (schimbări de cinetică enzimatică, de degradare, influențe hormonale) ; 6) stabilirea sinteniei și cartarea cromozomală ; 7) secvențierea polipeptidului alterat ; 8) izolarea genei corespunzătoare și studiul ei sistematic fizico-chimic și biologic (cap. III, XIV). Cînd nu se ocupă de populațiile umane, diferitele studii sînt însoțite de mutageneze induse, selecții și împerecheri planificate. Acestea, ca și primele cinci moduri de abordare enumerate mai sus, pot fi efectuate în unități de investigație cu dotare medie (rutinieră), cu condiția de a avea ca „instrument" de concepție și de interpretare — cunoștințele de genetică — (vezi prefața). Importanța dezideratului a fost ilustrată în întreaga dezvoltare a geneticii, începînd cu metodologia lui Mendel ; cultivînd mazăre pe o parcelă de 50 m² cu metode și mijloace horticole banale, dar într-un sistem de model experimental cu o concepție de geniu, el a întemeiat știința geneticii. Ca urmare rezultă că, pe lîngă aparatura de vîrf foarte importantă și cerută cu necesitate, cunoașterea geneticii moleculare devine obligatorie cu o prioritate de necontestat.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul XII

ASPECTE MOLECULARE ALE CARTOGRAFIEI (CARTĂRII) GENETICE

1. Generalități asupra principiilor morganiene de cartare genetică și relațiile lor cu studiile moleculare. Unitățile funcționale de informație genetică, genele, sînt segmente ale moleculei unice de ADN din cromozom, au continuitate fizică asigurată de unitatea chimică a ADN și au o succesiune specifică de-a lungul cromozomului. Intervalul ocupat de fiecare genă, denumit locus, este delimitat de genele adiacente și ca urmare a structurii fizice a ADN fiecare locus are aceeași poziție într-un cromozom dat și în cromozomii derivați prin replicare din acesta. Reprezentarea grafică a pozițiilor ocupate de genele unui cromozom (sau a secvenței locilor genici) se numește hartă genică iar metodele genetice și moleculare care stabilesc pozițiile de înscriere a locilor genici particulari într-o hartă genetică poartă denumirea de cartografiere genetică sau cartare genetică (engl. *genetic mapping*) (se preferă termenul de cartare datorită avantajelor descriptive).

În cartarea genetică cele mai deosebite progrese au fost obținute în defalcarea markerilor genetici macrostructurali folosiți de analizele clasice de genetică și utilizarea din ce în ce mai frecventă a markerilor moleculari (enzime și alte proteine modificate prin evenimente mutaționale care permit urmărirea alelelor corespunzătoare). Metodele clasice de analiză genetică pe baza legilor lui Mendel de transmisie ereditară și a principiilor lui Morgan rămîn ca un fundament din care au derivat modificări de analiză corespunzătoare organismelor aflate într-o observație (virusuri, bacterii, organisme superioare, om).

Principiile de bază în cartarea genetică au fost stabilite de Morgan (1911, 1915) prin studiile de genetică efectuate la *Drosophila melanogaster*. Ele sînt următoarele: 1) Transmisia ereditară a caracterelor, segregarea și asortarea trăsăturilor marker (cap. XI) au loc pe grupe care numeric corespund la perechile omoloage de cromozomi; 2) Trăsăturile marker din cadrul aceluiași grup de caractere se reasociază între ele, ceea ce indică interschimb de alele corespunzătoare între cromozomii omologi, aceste reasocieri semnificînd recombinări de alele aparținînd la markeri diferiți; 3) Recombinările intercromozomice omoloage au loc prin *crossing-over* iar substratul morfologic

Scanned with OKEN Scanner

al acestuia îl constituie chiasma din diviziunea meiotică ; 4) Frecvența de recombinare între perechile alelice cu diferențe marker din cadrul aceleiași perechi omoloage de cromozomi este în funcție de distanța de localizare : cu cît distanța este mai mare, cu atît frecvența de recombinare este mai mare ; 5) Ca urmare, procentul de recombinanți într-o populație de progeni, raportat la doi markeri luați în studiu, indică valoarea relativă a distanței dintre cei doi markeri. Unitatea de distanță este definită ca unitatea procentuală de recombinanți (1% recombinanți) și poartă numele de unitate de recombinare. Ultimele două principii formulate de Morgan au fost esențiale pentru metodologia cartării genetice, au stat la baza inițierii în constituirea de hărți genetice, și constituie și în prezent criteriul fundamental de cartare genetică de la care derivă diferite variante în funcție de numărul markerilor, particularitățile organismelor studiate, tipul de interschimb, nivelul genetic de analiză (cartare intergenică sau cartare infragenică). Din aceste motive, unitatea de recombinare se numește centimorgan (adică unitate de distanță exprimată în procent de recombinanți definită de *Morgan*). De exemplu, în ilustrarea din fig. 107, deoarece recombinanții $+c$ și $a+$ sînt 10% din totalul progenei, distanța dintre locii a și c este de 10 centimorgani. Principiul lui Morgan — al proporționalității directe dintre frecvența de recombinare și distanța dintre markerii aflați pe același cromozom — se bizuie fizic pe probabilitatea mai mare a evenimentelor de *crossing-over* pe distanțe mai mari : cu cît distanța dintre doi markeri este mai mare, cu atît probabilitatea mai multor evenimente de *crossing-over* crește și cu atît mai crescut va fi procentul de recombinanți. Înscrierea în harta genetică conform principiului nu ia în considerație dimensiunea locilor. Aceștia sînt considerați ca puncte înscrise la distanțe proporționate de centimorganii găsiți între diferiți loci cu markeri genetici. Prin testul de doi factori se pot stabili numai distanțe relative exprimate în centimorgani, dar nu se determină adiacența între markeri diferiți de cei testați în cadrul grupului de lincaj și nici ordinea lor. De exemplu, în fig. 94 markerii *a*, *b* și *c* nu pot fi interconectați și înscriși în hartă prin testări independente *a* și *b*, *b* și *c*, *a* și *c* și calcule independente.

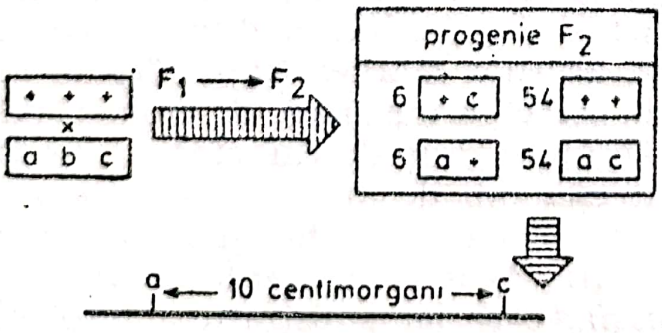


Fig. 94. Recombinarea între două caractere marker a și c trecînd printr-o meioză asigurată de generația F. Procentul de recombinați a+ și +c se află prin formula, sumă de recombinați totalul progeni ×100, adică 12/120 × 100 = 10%.

Scanned with OKEN Scanner

Aceşti markeri pot fi în ordinea *abc*, dar şi în ordinea *acb* sau *bca* etc. De aceea s-a introdus utilizarea frecvenţelor de recombinare a trei markeri fie prin teste de doi factori care implică pe rînd cei trei markeri (*a* cu *b*, *b* cu *c* şi *a* cu *c*) şi interpretarea rezultatelor potrivit cu teorema de adiacenţă a frecvenţelor de recombinări, fie testul de trei factori.

Teorema adiacenţei de frecvenţe ale recombinărilor. În testarea a trei markeri aflaţi în acelaşi grup de lincaj, *a b* şi *c*, cea mai mare dintre cele trei frecvenţe de recombinare f_{ab}, f_{bc} şi f_{ac} rezultate din testele de doi factori este egală cu suma celorlalte două frecvenţe mai scăzute, sau mai mică. Dacă, de exemplu, f_{ac} este cea mai mare, atunci se stabileşte relaţia:

$$f_{ac} \leqslant f_{ab} + f_{bc}.$$

Dacă valoarea relaţiei este mai mică, atunci între markeri nu există adiacenţă (markerii nu sînt aditivi). Neadiacenţa (neaditivitatea) dedusă din relaţie se datorează faptului că distanţa mare dintre *a* şi *c* permite evenimente multiple de *crossing-over* care pot inversa starea de recombinant dată de un prim *crossing-over*, într-un lincaj de tip parental, prin al doilea. Dacă valoarea relaţiei este egală, atunci cei trei markeri sînt apropiaţi iar poziţia lor este stabilită prin raţionamentul că factorii cu cea mai mare frecvenţă de recombinare sînt la extreme iar al treilea se află între ei. De exemplu: dacă distanţa *a*—*c* este de 10 centimorgani iar distanţa *a*—*b* este de 7 centimorgani cei trei markeri sînt lincaţi fie *abc*, fie *cba*.

Testul de trei factori adiacenţi. Foloseşte un principiu derivat tot din conceptul lui Morgan şi a fost utilizat în analizele de lincaj la majoritatea speciilor la care s-au efectuat cartări genetice (*Drosophila*, *Zea mays*, *Mus musculus*, *Neurospora*, bacterii, sisteme fag-bacterii). În acest caz, se formulează principiul că frecvenţa recombinanţilor rezultaţi dintr-un singur eveniment de *crossing-over* este totdeauna mai mare decît a recombinanţilor care pentru a se produce necesită două evenimente de *crossing-over*. Dacă se admite, de exemplu, că frecvenţa unui *crossing-over* într-o regiune genetică dată, t_1t_2h, este de 10^{-2}, atunci probabilitatea ca două evenimente de *crossing-over* să se producă simultan în aceeaşi regiune este egală cu produsul a două valori asemenea, adică $10^{-2} \times 10^{-2} = 10^{-4}$. Această diferenţă a frecvenţelor de *crossing-over* poate preciza modul de interconectare a trei markeri t_1, t_2, h, cînd unul dintre ei este luat ca marker de referinţă cunoscut ca fiind în afara interconectării celorlalţi doi (fig. 95). De exemplu, în cazul markerilor t_1, t_2, h alelele locusului h sînt de referinţă şi atunci interconectările pot avea numai două eventualităţi fie t_1—t_2—h, fie t_2—t_1—h. Ca urmare a acestei simplificări, se testează fiecare eventualitate prin recombinări de organisme parentale cu următoarele configuraţii alelice pentru cei trei loci: $+$, t_2, $+ \times t_1$,

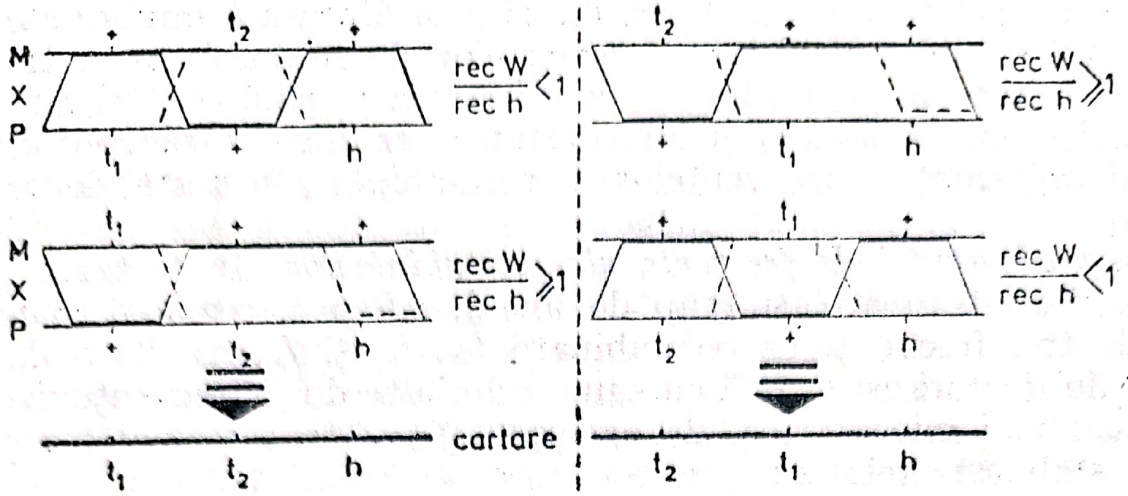


Fig. 95. **Ilustrare grafică a testului de trei factori pentru locii t_1, t_2, și h ca factor de referință.** Din mulțimea de progeni se numără numai recombinanții de tip sălbatic (W) și recombinanții purtători ai markerului h. În stînga sînt redate valorile rapoartelor în eventualitatea ordinii de lincaj t_1-t_2-h iar în dreapta cele care indică lincajul t_2-t_1-h.

+, *h* și t_1, +, + × +, t_2, *h* (simbolul + semnifică alela de tip sălbatic pentru fiecare alelă marker). În eventualitatea ordinii t_1-t_2-h, din prima împerechere va rezulta un număr de recombinanți de tip sălbatic (*W*) mult mai mic decît recombinanții *h*, deoarece pentru recombinantul de tip sălbatic sînt necesare două evenimente de *crossing-over* (fig. 95), pe cînd pentru recombinantul *h*, numai unul. Din a doua împerechere recombinanții *W* și *h* vor apărea cu o frecvență fie egală, fie în favoarea tipului *W*. Dacă ordinea de lincaj este t_2-t_1-h, atunci rezultatele împerecherilor vor fi inversate conform explicațiilor din fig. 95. În general, testul de trei factori este aplicat la grupe de trei markeri a căror adiacență de lincaj este sugerată în prealabil prin testele de doi factori și realizează o mai mare siguranță în cartare. Aplicarea lui la markeri neaditivi determină ca rezultatele obținute să fie expuse acelorași erori date de evenimente multiple de *crossing-over*. Testul de trei factori a fost utilizat cu succes pentru analizele de cartare fină intragenică a mutanților punctiformi aparținînd aceluiași locus.

Cartările clasice pe baza principiilor morganiene ale recombinării au realizat analize genetice de mare acurateţe iar metodologia stabilită cu ani în urmă constituie și în prezent o parte esențială a geneticii. Majoritatea analizelor moleculare se bazează pe datele stabilite de clasici și multe dintre schimbările moleculare ale expresiei genice de tip mutațional sînt logic interpretate pe baza concepțiilor clasice (cap. XI). Metodele de cartare clasică prin împerecheri între organisme purtătoare de markeri și calculul frecvențelor de recombinare prin numărarea recombinanților în progenie au întîmpinat dificultăți statistice numeroase datorită proprietăților manifestate de evenimentele

Scanned with OKEN Scanner

de *crossing-over*, deşi acestea stau la baza cartării. Proprietăţile evenimentelor de *crossing-over* inductoare de dificultăţi de cartare se împart în proprietăţi inductoare de anomalii de cartare pentru markeri neadiacenţi (evenimente multiple de *crossing-over* care anulează o parte din rezultatele recombinării prin readucerea markerilor la lincajul de tip parental) şi proprietăţi care induc anomalii de cartare a markerilor apropiaţi. Ultimele sînt legate de structura fizică a heteroduplexului şi de evenimentele moleculare (excizii excesive, sinteze de monocatene, legări eronate) care duc la rezolvarea heteroduplexului. Aceste proprietăţi sînt : a) interferenţa pozitivă prin care un heteroduplex sediu al unui *crossing-over* interferează cu producerea de alte evenimente de *crossing-over* pe o distanţă oarecare din cromozom datorită torsionărilor de heteroduplex şi rigidităţii structurale cromatidiene; b) interferenţa negativă care constă dintr-o creştere a frecvenţelor de recombinare între markeri foarte apropiaţi ale căror segmente alelice cuprinse în heteroduplex sînt secţionate şi rearanjate în multiple feluri ; c) conversia genică rezultată fie din copieri excesive, fie din excizii excesive (cap. XI) şi care modifică raporturile statistice între recombinanţi. Construirea de hărţi genetice corespunzătoare grupelor de lincaj la diverse organisme a solicitat eforturi mari şi timp, fiecare marker înscris într-o hartă fiind rezultatul unei lucrări sau mai multor lucrări, iar toate acestea s-au cumulat şi conectat în hărţi genetice. Hărţile genetice sînt „construcţii" uriaşe bazate pe un efort internaţional şi determinarea fiecărui lincaj de doi sau trei markeri a constituit un succes remarcabil. De exemplu, cartarea celor peste 400 de markeri genici în 10 grupe de lincaj ale cromozomilor de porumb cu hărţile genetice respective constituie rezultatul unui efort de zeci de ani depus de numeroase laboratoare. Mai mult, pentru o singură experienţă de analiză cartografică cu un test oarecare, numărul de descendenţi testaţi trebuie să fie în majoritatea cazurilor de ordinul a $10^2 - 10^3$, mai ales în testele de adiacenţă unde recombinanţii sînt rari. La bacterii, posibilităţile de selecţie prin inoculări replicate şi îmbogăţire a recombinanţilor prin markeri contraselectivi (cap. XIII şi XIV) permit analiza unui număr mare de descendenţi ($10^7 - 10^8$) şi depistarea de recombinanţi foarte rari rezultaţi din *crossing-over* intragenic între mutanţi purtători de markeri corespunzători la segmente de genă sau la o pereche nucleotidică. Conform principiilor de bază ale cartării, este necesar ca markerii analizaţi şi cartaţi să fie raportaţi la cromozomii deţinători ai locilor corespunzători. Înscrierea markerilor genetici în cromozomul care deţine locii corespunzători markerilor testaţi se numeşte sintenie (Renwick, 1971) (gr. *sin* = împreună, *tenion* = filament). Prin markeri sintenici se înţeleg markerii ai căror loci se găsesc în acelaşi cromozom şi implicit lincaţi în acelaşi grup ; termenul nu specifică şi modul de interconectare. Stabilirea sinteniei constă

Scanned with OKEN Scanner

din studiile comportării markerilor genetici prin raportare la comportarea cromozomilor observați citogenetic sau molecular și se numește înregistrare cromozomică a markerilor (engl. *cromosomal assignement*), activitate care realizează în final cartografia genetică fizică a cromozomilor.

2. Sintenia la genoamele pluricromozomale și cartografia cromozomală. Pentru analiza genoamelor pluricromozomale, stabilirea corespondenței dintre grupele de lincaj și cromozomii individuali a constituit o problemă esențială pentru cartarea genetică. Deși aparent independente, sintenia markerilor, cartările genetice și cartările fizice cromozomale se găsesc strîns conectate și conduc final la harta genetică referită direct la structura genomică.

Primele sintenii și hărți fizice cromozomale au fost realizate la *Drosophila* datorită avantajului morfologic oferit de prezența cromozomilor giganți în celulele glandelor salivare la diptere (Bridges și Brehme, 1944). Cromozomii giganți sînt constituiți din mii de molecule identice de ADN distribuite în paralel locus pe locus, ceea ce determină o amplificare fizică a unui locus genic de la structura sa uninemică submicroscopică la dimensiuni vizibile cu ajutorul microscopului. Regiunile genetice submicroscopice formează prin suprapunere multinemică benzi transversale eterocromatice (dense) și eucromatice (clare). Amplificările structurale transversale de la nivelul glandelor salivare reproduc la scară superioară structurile cromozomale din toate celelalte celule ale organismului dipteric, inclusiv pe cele din zigot și din gameții care au procreat organismul în observare. Astfel, aberațiile structurale concomitente unei mutații generatoare de marker genetic pot fi observate microscopic la nivelul cromozomilor giganți, fie ca modificări în spectrul de benzi (deleții translocații, inversii), fie ca perturbări în configurația împerecherilor somatice. Inducția mutagenă a unei diferențe marker folosită în analize genetice este adesea însoțită și de schimbări în cromozomii giganți. În consecință, urmărire a paralelă a lincajului genetic între aberații cromozomice diverse și a markerilor fenotipici a permis stabilirea atît a sinteniei, cît și a hărților fizice cromozomale.

La celelalte organisme pluricromozomale fără cromozomi giganți, testarea sinteniei și alcătuirea de hărți fizice cromozomale au fost handicapate. Acest neajuns, prezent în particular la mamiferele superioare și la om, a fost micșorat prin ameliorarea tehnicilor de citogenetică în observareà cromozomilor meiotici și folosirea culturilor de celule somatice *in vitro* pentru examinarea cromozomilor metafazici. Tehnicile de bandare cromozomică, adîncirea cunoașterii markerilor genetici, de la caractere morfologice pînă la diferențe de structură moleculară a proteinelor, hibridările celulelor somatice *in vitro*, hibridările ARN—ADN *in situ* sînt tot atîtea posibilități de determinare a

Scanned with OKEN Scanner

sinteniei şi a poziţiei genelor în cromozomi. Aceste metode moderne de cartare sînt într-o continuă completare reciproc utilă cu sistemele de cartare prin analiza frecvenţelor de recombinare.

1. *Bandarea cromozomală din analizele citogenetice în ajutorul sinteniei şi cartării markerilor genetici.* Examenele citogenetice clasice bazate pe studiul cromozomilor în metafază observaţi în preparate tisulare au fost utile pentru plante (în special, pentru porumb) la stabilirea sinteniei. Astfel, la porumb corelarea transmisiei de markeri genetici împreună cu aberaţii cromozomale vizibile, spontane sau induse, cît şi modul de segregare particular al unor cromozomi au permis stabilirea sinteniei a numeroşi markeri la cromozomii corespunzători (Goodenough şi Levine, 1974). La mamiferele superioare şi la om, culturile de celule *in vitro* au permis progrese superioare în analiza numerică şi structurală a cromozomilor. Totuşi, citogeneticii clasice îi scăpau multe din aberaţiile cromozomice de finețe care prin corelaţie cu markeri genetici ar furniza date pentru stabilirea sinteniei. Studiul citogenetic a cunoscut în ultimii zece ani un mare progres în analizele fine ale cromozomilor mitotici şi meiotici datorită bandării cromozomilor. Prin bandare se înţeleg o serie de tehnici relativ standardizate de tratare a cromozomilor metafazici sau meiotici cu o diversitate de agenţi chimici sau fizici care au proprietatea să inducă un spectru de benzi clare şi întunecate de-a lungul cromozomilor. Aceste benzi puse în evidenţă fie prin fluorescenţa compusului chimic folosit pentru evidenţierea cromozomilor, fie prin colorații rutiniere, au destul de constant acelaşi spectru pentru fiecare cromozom (foto XXIII). Bandarea cromozomilor, iniţiată de Caspersson şi colab. (1968, 1969, 1970, 1971), a fost apoi completată de Dutrillaux şi colab. (1971), de Drets şi Shaw (1971) şi răspîndită în scurt timp în întreaga lume (Dutrillaux şi Lejeune, 1975). Tehnologia relativ simplă a bandării a permis abordarea ei într-un mare număr de laboratoare şi folosirea pentru analize citogenetice a unui număr impresionant de specii. Spectrele de benzi, Q, R şi G (foto XXIII) permit identificarea chiar de fragmente cromozomale şi au adus o creştere prodigioasă a identificărilor de aberaţii cromozomale imposibil de observat cu tehnicile clasice de citogenetică. Zonarea cromozomilor, aşa cum este ilustrată în foto XXIII, permite cartarea markerilor genetici în poziţii fizice raportate la structura cromozomilor. Unele aberaţii de structură, ca inversiile paracentrice şi micile inversii pericentrice, duplicaţiile, translocaţiile multiple concomitente genezei de diferenţe marker, pot fi observate cu ajutorul bandării. De exemplu, Lamm şi colab. (1974), folosind tehnicile de bandare, au pus în evidenţă o inversie în perechea a 6-a de cromozomi la om, însoţită de schimbări marker în expresia antigenelor de histocompatibilitate, ceea ce a permis stabilirea sinteniei regiunii de histocompatibilitate HLA în cromozomul 6.

Scanned with OKEN Scanner

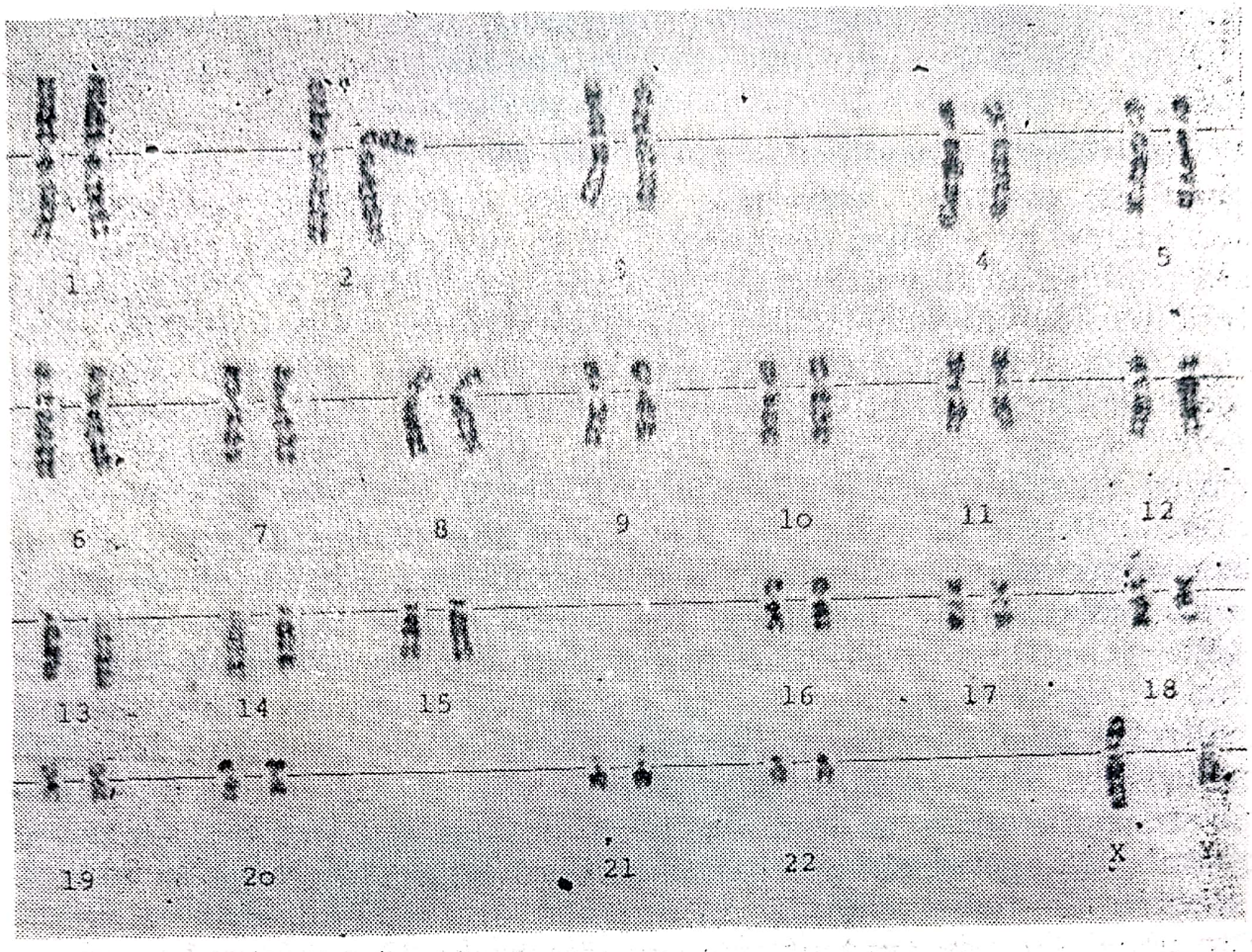


Foto XXIII — **Bandare de tip G a cromozomilor umani** (M. Mikkelsen, Kennedy Instituttet Gostrup, Danemarca). În raport cu tehnicile de bandare, sînt 5 tipuri de benzi: *benzile Q* = benzi fluorescente obținute prin tratarea cromozomilor cu quinacrin-muștar (Cassperson și colab., 1969, 1970) — spectrele lor sînt de referință; *benzile G* (Giemsa) sînt obținute prin tratamente variate ale cromozomilor (cu enzime proteolitice sau cu alcalii) și colorație Giemsa cu diferite modificări. Ele au aceleași localizări ca și benzile Q și sînt cele mai utilizate datorită facilităților tehnice; *benzile R* (de la *reverse*), evidențiate de Dutrillaux și colab., 1971); se obțin prin denaturare termică apriorică unei colorări fie cu Giemsa, fie cu acridinorange, sînt intercalate cu benzile Q sau G; *benzile C* evidențiază heterocromatina constitutivă pericentromerică și *benzile T* (de la *terminal*), descrise de Dutrillaux, evidențiază telomerele. Obișnuit, numai bandările G, Q și R sînt folosite pentru sintenii și cartări cromozomice.

2. *Analiza citogenetică a meiozei în scopul cartării cromozomale.* Începînd cu studiile autoradiografice ale lui Taylor (1965), s-a demonstrat că chiasma meiotică este sediul unui eveniment de *crossing-over*, așa cum de fapt se credea pe vremea lui Morgan, fără a exista însă pe atunci o bază experimentală elocventă. La organismele cu posibilitatea individualizărilor clare de cromozomi meiotici, cum este *Zea mays*, numărul de chiasmata (gr. pluralul de la *chiasma*) poate fi cu ușurință stabilit și fiecare chiasma poate fi localizată prin bandare la o regiune cromozomică cu doi markeri cărora, deși sintenici, nu li se cunoaște distanța în centimorgani. Pentru a o stabili se observă un număr semnificativ de meioze (peste 2000) și se marchează cîte meioze

Scanned with OKEN Scanner

au chiasma la nivelul celor doi markeri. Numărul de centimorgani este dat de formula:

$$\frac{\text{nr. de meioze cu chiasma la nivelul locilor}}{\text{nr. total de meioze observate}} \times 100.$$

De exemplu, dacă la cei doi markeri observați au fost găsite 20 de meioze cu chiasma din 2000 de meioze, atunci:

$$\frac{20}{2000} \times 100 = 1 \text{ centimorgan.}$$

Totodată, cunoscîndu-se numărul de chiasmata/celulă meiotică și faptul că numărul de chiasmata pe cromozom este în raport și cu lungimea cromozomului (cu cît cromozomul este mai lung, cu atît frecvența de chiasmata va fi mai mare), printr-o raportare simplă se poate calcula frecvența medie de chiasmata pentru fiecare cromozom. Cu ajutorul acesteia se determină lungimea totală a hărții genetice corespunzătoare cromozomului după formula:

$$\left(f_m \times \frac{1}{2}\right) \times 100,$$

în care f_m = frecvența medie de chiasmata/cromozom, $\frac{1}{2}$ este factorul de corectare pentru *cross-over*-e multiple care prin inversări de lincaj recombinant reduc frecvența de *cross-over*-e (chiasmata) cu semnificație recombinantă la jumătate iar înmulțirea cu 100 se efectuează datorită faptului că centimorganii reprezintă procente de recombinanți. De exemplu, pentru perechea a 7-a de cromozomi de la *Zea mays* frecvența medie de chiasma raportată la lungimea cromozomului este de 2,3 și atunci $\left(2{,}3 \times \frac{1}{2}\right) \times 100 = 115$ centimorgani. Confruntarea acestei valori cu cea obținută prin analiza progenilor pentru recombinanți a demonstrat că cele două valori sînt apropiate.

La om, bandarea cromozomilor permite nu numai stabilirea sinteniei, ci și a pozițiilor regiunilor genetice mari, așa cum s-a subliniat mai sus pentru regiunea genetică HLA. Utilizarea analizei cromozomale meiotice prin bandare a permis stabilirea distanței markerilor genetici ai regiunii HLA din cromozomul 6 (Svejgaard și colab., 1975). Un studiu combinat al frecvenței chiasmata la nivelul benzilor care cuprind regiunea HLA (tabelul 14), efectuat pe 4614 diviziuni meiotice, a stabilit un număr de 40 chiasmata între locii A și B ai acestei regiuni. În consecință, distanța în centimorgani dintre A și B este calculată astfel:

$$\frac{40}{4614} \times 100 = 0{,}87 \text{ centimorgani,}$$

Scanned with OKEN Scanner

valoare foarte apropiată celei obținute prin frecvența recombinanților HLA observați în studii pe eșantioane mari de familii.

3. *Hibridizările celulare somatice ca procedeu de stabilire a sinteniilor și cartării genetice cromozomale folosind markeri moleculari.* Pentru analizele de cartare cromozomală culturile de celule au dat posibilitatea dezvoltării unei metodologii care aduce un mare progres în determinarea sinteniilor și cartării genetice la om și la alte vieţuitoare multicromozomale. Această metodologie este denumită cartare prin hibridizare celulară somatică. Prin hibridizare celulară somatică se înțelege fuziunea citoplasmatică a două celule cu fenotipuri diferite și formarea unui sinciţiu cu două nuclee urmată adesea de fuziunea nucleelor după o mitoză, prin care se formează celule sincarion. Deși fuziunile celulare somatice au fost sugerate încă din secolul al XIX-lea ca mecanism de formare a celulelor polinucleate (mecanismul sinciţial), descoperirea hibridizărilor celulare somatice între celule cultivate în amestec *in vitro* a avut loc mult mai recent. Barski și colab. (1960) au izolat primul hibrid celular produs spontan prin cultivarea în amestec a două linii celulare de sarcom de șoarece, iar în 1965 Harris și Watkins obțin hibrizi celulari interspecifici inducînd fuziunea citoplasmatică prin acțiunea virusului Sendai inactivat cu ultraviolete (fig. 96). Datorită frecvenței mult mai mari de fuziune indusă și unui spectru taxonomic mai larg de hibridizare celulară, această metodă este predominant utilizată aducîndu-i-se diverse modificări. Hibridizări celulare au fost obținute în combinații variate: om × șoarece, om × hamster chinezesc, șobolan × șoarece, celule de om × eritrocite de găină etc.

Din multiplele experiențe de hidridizări celulare, două observații au condus la folosirea hibrizilor celulari somatici în determinarea sinteniei și cartării genetice cromozomale: a) Celulele hibride codifică (transcriu și traduc) genele din ambele garnituri cromozomale și pro-

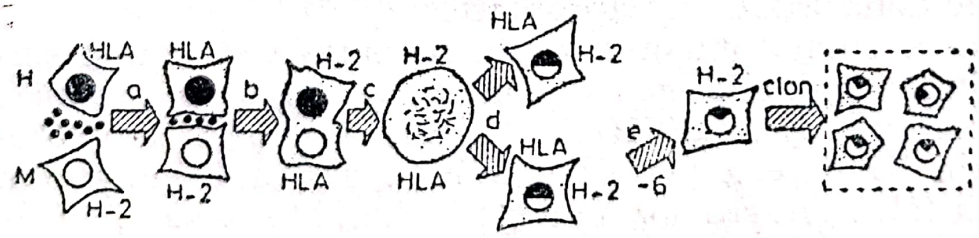


Fig. 96. Hibridizare somatică între celule umane (H) și celule murine (M): a = atașarea celulelor sub acțiunea virusului Sendai inactivat cu UV (Harris și Watkins, 1965); b = fuziunea sinciţială și producerea unui heterocarion; c = intrarea heterocarionului în diviziune; d = diviziune și formarea de sincarioni producători de antigene de histocompatibilitate umane (HLA) și murine (H—2): e = eliminarea autozomului 6 și producerea unei celule care a pierdut HLA; această celulă formează o coloană fără autozom 6 și fără HLA (schemă inspirată după Ringertz și Savage, 1976). Pierderea capacității de a sintetiza HLA, concomitentă eliminării de autozom 6, permite înregistrarea genelor HLA în acest autozom.

Scanned with OKEN Scanner

duc astfel ARNm și proteine caracteristice speciilor de origine pentru hibridul celular. Deși majoritatea enzimelor sînt comune speciilor de proveniență (și omul și șoarecele au LDH, HGPRT, PGM etc.), totuși aceeași enzimă diferă de la o specie la alta prin migrare electroforetică ; b) Celulele hibride în proliferare elimină cromozomii sincarionului format, de preferință cei aparținînd numai uneia dintre speciile de origine iar eliminarea de cromozomi este însoțită și de pierderea expresiei fenotipice corespunzătoare (hibridul nu mai produce enzime, antigene, diverse proteine ale căror gene aparțin cromozomilor pierduți). Pierderile de cromozomi au loc prin perturbările de segregare a cromozomilor în timpul diviziunilor care au ca rezultat celule cu mai puțini cromozomi și celule cu mai mulți cromozomi. Corelația dintre eliminările cromozomale și dispariția sintezei unor proteine (LDH de tip uman, PGM_3 umană, antigene HLA) permite clar identificarea cromozomilor posesori ai genelor producătoare ale anumitor enzime și precizează sintenia acestora. Utilizarea eliminării cromozomilor pentru stabilirea sinteniei a fost sugerată de Weiss și Green (1967). Dintre hibrizii celulari interspecifici o parte pierd cromozomii conform listei următoare (Ringertz și Savage, 1976) : șoarece + om — cromozomii umani ; hamster chinezesc + om — cromozomii umani ; om + țînțar — — cromozomii de țînțar ; om + maimuță — cromozomi de maimuță ; șoarece + catîr— cromozomii de catîr ; șoarece + găină — cromozomii de găină.

a) *Stabilirea sinteniei prin eliminări cromozomale și pierderi concomitente de expresie genică.* A fost folosită preponderent în analizele de markeri umani, în hibrizi celule de om — celule de șoarece. Se construiesc independent un număr mare de hibrizi somatici și se fac analize cromozomale la fiecare linie hibridă. Deoarece eliminarea cromozomilor se produce la întîmplare, rezultă o varietate de clone, fiecare deținînd o parte din genomul uman și genomul de șoarece. Se examinează electroforetic proteinele marker și se face corelația dintre cromozomii eliminați și proteinele care nu mai sînt exprimate. O metodă mai avansată constă din obținerea unui hibrid care să rețină un singur cromozom uman. În acest caz, toate proteinele umane exprimate în hibrid își au genele corespunzătoare sintenic în cromozomul reținut. Un astfel de hibrid s-a obținut pentru cromozomul X uman folosindu-se o tehnică de selecție bazată pe gena de HGPRT-ază ca factor selectiv. Celule murine $HGPRT^-$ (deficiente) au fost puse în condiții de fuziune cu celule umane $HGPRT^+$ și apoi au fost trecute pe un mediu cu *h*ipoxantină-*a*minopterină-*t*imină (mediul HAT). Pe acest mediu au crescut numai hibrizii celulari, deoarece numai celulele cu HGPRT puteau sintetiza nucleotide purinice din hipoxantină și puteau prolifera (sinteza *de novo* a nucleotidelor purinice era blocată prin aminopterină). Prin creșteri succesive pe mediul HAT au fost înlăturate toate clonele cu diferite eliminări cromozomale și a rămas

Scanned with OKEN Scanner

final numai clona posesoare a cromozomului X uman purtător al genei HGPRT și producător de HGPRT-ază.

b) *Cartare regională prin hibridizări celulare.* Metoda hibrizilor celulari s-a dovedit utilă și în stabilirea ordinii liniare a genelor sintenice, cît și a distanțelor dintre gene. Pentru aceasta la om s-au utilizat două metode:

— *Hibridizări somatice cu celule parentale purtătoare de anomalii structurale.* Tulpini celulare derivate de la organisme cu translocații la cromozomi cu markeri cunoscuți sînt hibridizate interspecific cu celule murine. În eliminările cromozomice ulterioare se constată care marker uman este coeliminat cu cromozomul acceptor de translocație și acesta este înregistrat în poziția indicată de fragmentul translocat, în harta genetică a cromozomului donor.

— *Inducție de fragmentări cromozomale prin tratarea celulei cu un mutagen și hibridizarea cu celule netratate.* Este o metodă care necesită cunoașterea sinteniei markerilor testați și poziția unui marker de referință. Ca urmare se utilizează după analize genetice prealabile de sintenie și are rolul de a stabili ordinea genelor în grupul de lincaj (Goss și Harris, 1975). Primul cromozom uman vizat în astfel de analize a fost gonozomul X la care gena pentru producția de HGPRT a fost luată ca marker de referință pentru genele care codifică fosfoglicerat-kinaza (*PGK*), α-galactozidaza (*α gal*) și glucoza-6-fosfat-dehidrogenaza (G_6PD) (tabelele 13 și 14). Eșantioane celulare au fost tratate cu doze diferite de radiații X, hibridizate cu celule de hamster chinezesc HGPRT$^-$ și apoi trecute pe mediul selectiv HAT unde au crescut numai hibrizi cu gena *HGPRT*$^+$ umană. S-a observat că hibrizii pierd celelalte gene sintenice urmărite (*PGK*, *α gal* și G_6PD) în funcție de distanța față de gena selectivă (*HGPRT*) de referință, deoarece cu cît distanța dintre gene este mai mare, cu atît probabilitatea de fragmentare este mai mare. Pe baza acestui raport s-a putut stabili ordinea *PGK-α gal-HGPRT-*G_6PD.

c) *Sintenie și cartare cromozomală prin alte procedee.* Înscrierea locilor genici în cromozomi se mai realizează prin: a) hibridizarea *in situ* dintre ARN cunoscut și gena corespunzătoare; b) secvențierea aminoacidică a proteinelor anormale; c) salvarea virusurilor tumorale integrate; d) inducția de leziuni cromozomale în situri specifice cu ajutorul virusurilor integrante cu situri specifice de integrare.

— *Hibridizări de acizi nucleici in situ.* Deoarece diferitele tipuri de ARN sînt transcrieri ale genelor cromozomale, fiecare ARN trebuie să aibă capacitatea de a hibridiza cu segmentul de ADN care a avut rol de matriță în transcrierea sa (Pardue și colab., 1974). În consecință, dacă un preparat cromozomal tratat termic ca pentru bandare de tip R este acoperit cu soluție de ARN antolog speciei respective, acest ARN se atașează prin împerecheri specifice genei corespunzătoare și implicit cromozomului care o poartă și formează un hibrid ARN-

Scanned with OKEN Scanner

ADN. Pentru observarea acestei reacții specifice trebuie ca ARN să fie marcat cu un izotop radioactiv iar evidențierea hibridizării se efectuează prin autoradiografie. Prin această metodă se poate stabili cromozomul în care se află gena corespunzătoare la ARN marcat. S-a mai utilizat ADN complementar marcat cu ^{3}H-dTTP sintetizat prin transcriere inversă pe matrițe de ARNm. Metoda de hibridizare moleculară a confirmat pozițiile genelor ribozomale umane în cromozomii acrocentrici mari și mici (perechile 13—15 și respectiv 21—22) la nivelul structurilor secundare și a indicat locii pentru genele α^{Hb} și β^{Hb} codificatoare ale lanțurilor polipeptidice ale hemoglobinei *A* (tabelul 14).

Tabelul 14

Sintenîile pentru aproximativ 10% din locii cromozomali umani cunoscuți (întocmit după Ringertz și Savage, 1976; McKusick și Ruddle, 1977). Certitudinea de localizare: C = confirmare, la cel puțin două laboratoare; P = provizoriu = sintenia indicată de un singur laborator. Genomul uman ar cuprinde 50 000 de gene diferite din care se raportează prin markeri individualizați aproximativ 2000

Cromozom	Caracterul marker și locusul genic corespunzător		Metodele folosite	Certitudinea
Nr. 1	— Fosfopiruvat-hidrataza	*PPH*	S, F	C
	— 6-fosfogluconat-dehidrogenaza	*6PGD*	F, S	C
	— Adenilat-kinaza-2	*AK—2*	S	C
	— Gr. sanguin Rhesus	*Rh*	F, S, Ac	C
	— Eliptocitoza—1	*El—1*	F	C
	— Aniridia	*ANR*	F	P
	— Fosfoglucomutaza-1	PGM_1	F, S,	C
	— Amilaza pancreatică	*Amy-1*	F	C
	— Amilaza salivară	*Amy-2*	F	C
	— Alfa-L-fucozidaza	*αFUC*	S	C
	— Auriculo posteo displazia		F	C
	— Cataracta zonulară pulverulentă	*Cae*	F	C
	— Gr. sanguin Duffy	*Fy*	F	C
	— Uridil difosfat glucozo-pirofosforilaza	*UGPP*	S	P
	— Peptidaza C	*Pep—C*	S	C
	— Enolaza—1	*ENO—1*	S	P
	— Gr. sanguin Scianna	*Sc*	F	P
	— Uridin-kinaza	*UK*	S	P
	— Uridin monofosfat-kinaza	*UMPK*	S	C
	— ARN 5S (locus sau loci)	*RN5S*	H	C
	— Fumarat-hidrataza 1 și 2	*FH—1&2*	S	C
	— Guanilat-kinaza 1 și 2	*GUK—1&2*	S	C
	— Sit 1p și 1q pentru adenovirus 12	*AdV12—CMS—1q&1p*	V	C
Nr. 2	— Malat-dehidrogenaza—1	*MDH—1*	S	C
	— Fosfataza acidă—1	*ACP—1*	Ac	C
	— Activator de galactoză	*Gal+Act*	S	P
	— Izocitrat-dehidrogenaza—1 forma citoplasmatică	*IDH—1*	S	C

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 14 (continuare)

Cromozom	Caracterul marker şi locusul genic corespunzător		Metodele folosite	Certitudinea
Nr. 2	— Gr. sanguine MN şi caracterul secretor	*MN Ss*	F	P
	— Hemoglobina A lanţ β*	*Hb B*	H	P
	— Hemoglobina A lanţ δ	*Hb D*	P	P
	— Hemoglobina F lanţ A_γ	*HbF—A*	P	P
	— Hemoglobina F lanţ G_γ	*HbF—G*	P	P
	— Hemoglobina E lanţ ε	*Hb—Ep*	F, P	P
	— Interferon—1	*If—1*	S	P
	— α_1-antitripsina	*Pi*	F	P
	— Aril-hidrocarbon-hidroxilaza	*AHH*	S	C
	— Regiunea imunoglobulinică Gm dacă locusul *Pi* este sintenic cu locusul *ACP—1*	*gm*	F	P
Nr. 3	— Aconitaza mitocondrială	*ACO*	S	C
	— Sensibilitatea la virus herpetic	*HVS*	S	C
	— Galactoza-1-fosfat-uridil-transferaza	*GALT*	S	C
	— Fracţiunea de complementare termosensibilă (AF8)	*tsAF8*	S	C
Nr. 4	— Fosfoglucomutaza—2	PGM_2	S	C
	— Component specific de grup	*Gc*	F, S	C
	— Markerul adenină B care complementează celulele deficitare în formil glicinamid ribotid-aminotransferaza	*Ade+B*	S	C
	— Hemoglobine lanţ α	*Hb—A*	H	P
	— Hemoglobina Portland lanţ	*Hb—Z*	P	P
	— Activator de esterază	*Es-Act*	S	P
Nr. 5	— Hexozaminidaza B	*HexB*	S	C
	— Interferon-2	*If—2*	S	P
	— Sensibilitatea la tox. difterică	*DTS*	S	C
Nr. 6	— Pepsinogen	*Pg*	F	C
	— Regiunea de histocompatibilitate HLA cu seriile aloantigenice ca markeri lincaţi faţă de pepsinogen în ordinea următoare:			
	— seria A (primă)	*HLA—A*	S, AC, F	C
	— seria C (a treia)	*HLA—C*	F	C
	— seria B (a doua)	*HLA—B*	S, Ac, F	C
	— seria D (LD sau MLC)	*HLA—D*	F	C
	— Reglarea răspunsului imun (celular)	*Ir*	F	P
	— Antigen asociat răspunsului imun relevat pe limfocite B	*Ia*	F	P
	— Factorul properdinic B	*Bf*	F	C
	— Factorul C2 din complement	*C2*	F	C
	— Factorul C4 din complement	*C4*	F	C
	— Factorul C8 din complement	*C8*	F	C
	— Gr. sanguin Chido	*Ch*	F	C
	— Gr. sanguin Rodgers	*Rg*	F	C
	— Gr. sanguin P	*P*	F	C
	— β glicoproteină bogată în glicină	*βgly*	F	C
	— Receptor pentru C3b	*rC3b*	S	C

* genele de tip β sînt sintenizate şi în cromozomul numărul 11 de către alţi autori.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 14 (continuare)

Cromozom	Caracterul marker și locusul genic corespunzător		Metodele folosite	Certitudinea
	— Receptor pentru C3d	*rC3d*	S	C
	— Fosfoglucomutaza-3	PGM_3	S, F	C
	— Enzima malică-1	*ME—1*	S	C
	— Glioxilaza—1	*GLO—1*	S	C
	— Superoxid dismutaza-2(mitocondrială) sau indofenol-oxidaza B	*SOD—2*	S	C
	— Receptor pe celule B pentru eritrocite de maimuță	*MRBC*	S	C
Nr. 7	— Malat dehidrogenaza mitocondrială	MDH—2	S	C
	— Antigen de specie 7	SA—7	S	C
	— Sit de integrare SV40 cu antigen T de malignitate	SV40—T	S	C
	— Factorul Hageman	*HaF*	F	C
	— β-glicuronidaza	*GUS*	S	C
	— Hidroxiacil-CoA-dehidrogenaza	*HADHA*	S	C
Nr. 8	— Glutation-reductaza	*GSR*	S, Ac	P
Nr. 9	— Aconitaza solubilă	*ACO—S*	S	C
	— Adenilat-kinaza-1(eritrocitară)	*AK—1*	S	C
	— Adenilat-kinaza-3	*AK—3*	S	C
	— Argininsuccinat-sintetaza	*ASS*	S	C
	— Gr. sanguin ABO	*ABO*	F	C
	— Sindromul onicho-patelar (Nail-patella)	*NPa*	F	C
Nr. 10	— Glutamat oxalacetat-transaminaza—1	*GOT—1*	S	C
	— Hexokinaza—1	*HK—1*	S	C
	— Glutamat semialdehid-sintetaza	*GSS*	S	C
	— Adenozin-kinaza	*ADK*	S	C
	— Pirofosfataza anorganică	*PP*	S	C
Nr. 11	— Lactat-dehidrogenaza A(M)	*LDH—A*	S, F	C
	— Fosfataza acidă lizozomală	*ACP—2*	S	C
	— Esteraza—A4	*Es—A4*	S	C
	— Antigen letal de specie—3 loci	*Al*	S	C
Nr. 12	— Lactat-dehidrogenaza B(H)	*LDH—B*	S	C
	— Triozofosfat-izomeraza	*TPI*	S	C
	— Peptidaza B	*PepB*	S	C
	— Gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza	*GAPD*	S	C
	— Citrat sintetaza mitocondrială	*CS*	S	P
	— Serin hidroximetil-transferaza	*SHMT*	S	P
	— Enolaza—2	*ENO—2*	S	C
Nr. 13	— Esteraza — D	*ESD*	S	C
	— ARN ribozomal	*rRNA*	H	C
Nr. 14	— Purin nucleozid-fosforilaza	*PNP*	S	C
	— Triptofanil-ARNt-sintetaza	*TRPRS*	S	C
	— ARN ribozomal	*rRNA*	H	C
Nr. 15	— Izocitrat dehidrogenaza mitocondrială	*IDHm*	S	C
	— Piruvat kinaza—3	*PK—3*	S	C
	— Manozofosfat-izomeraza	*MPI*	S	P
	— Hexozaminidaza — A	*Hex—A*	S	P

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 14 (continuare)

Cromozom	Caracterul marker și locusul genic corespunzător		Metodele folosite	Certitudinea
	— β2-microglobulina	*β2M*	S	C
	— ARN ribozomal	*rRNA*	H	C
Nr. 16	— Adenil fosforibozil-transferaza	*APRT*	S	C
	— Haptoglobina α	*Hpα*	F	C
	— Lecitin colesterol acil-transferaza	*LCAT*	F	C
	— Timidin-kinaza mitocondrială	*TKm*	S	C
Nr. 17	— Timidin-kinaza solubilă	*TKs*	S	C
	— Galactokinaza	*GK*	S	C
	— Sit 17 de modificare cromozomică prin adenovirus 12	*AdV—CMS—17 V*		C
Nr. 18	— Peptidaza — A	*PepA*	S, Ac	C
Nr. 19	— Peptidaza — D	*PepD*	S	C
	— Glucozofosfat-izomeraza	*GPI*	S	C
	— Sensibilitatea la virus polio	*PVS*	S	C
	— Sensibilitatea la virus Echo	*ECS*	S	C
	— Fosfohexozo-izomeraza	*PHI*	S	C
Nr. 20	— Adenozin-dezaminaza	*ADA*	S	C
	— Enzima de conversie a desmosterol — colesterol	*DCE*	S	C
	— Inozin-trifosfataza	*ITP*	S	C
Nr. 21	— ARN ribozomal	*rRNA*	H	C
	— Proteină antivirală	*AVP*	S	C
	— Fosforibozilglicinamid-sintetaza	*GAPS*	S	C
	— Superoxid dismutaza-1(citopl.)	*SOD—1*	S, Ac	C
Nr. 22	— ARN ribozomal	*rRNA*	H	C
	— β-galactozidaza	*βGAL*	S	C
X	— Orbire pentru culori (Deutan-Protan)	*CB*	F	C
	— α-galactozidaza (boala Fabry)	*αGAL*	F	C
	— Glucoza-6-fosfat-dehidrogenaza	*G6PD*	F	C
	— Hemofilia clasică	HEM_A	F	C
	— Hipoxantin guanin fosforibozil-transferaza	*HGPRT*	F, S	C
	— Fosfoglicerat-kinaza	*PGK*	S	C
	— Antigen de specie X lincat (sau de suprafață)	*SAX*	S	C
Y	— Factor de determinare testiculară	*TDF*	F	C
	— Antigen de histocompatibilitate Y	*H—Y*	S	C

— *Secvențierea aminoacizilor unor proteine anormale*, ca hemoglobina Lepore și Kenya care demonstrează prin mecanismul lor de formare că locii A_γ, G_γ, δ și β sînt lincați în același cromozom.

— *Relațiile virusurilor tumorale cu cromozomii umani și genele care codifică sensibilitatea la virusuri*. Adenovirusul 12 și SV40 au capacitatea să se integreze în genomul celulelor umane în situri specifice unde produc modificări cromozomale și totodată apariția de antigene nucleare. De exemplu, concomitent transformării maligne genomul integrat de SV40 codifică formarea antigenului T. Prin eliminări

Scanned with OKEN Scanner

cromozomale s-a precizat că situl de inserție al SV40 se află în cromozomul 7, deși se pare că astfel de situri sînt mai multe în genomul uman. Infecția cu adenovirus 12 induce modificări cromozomale caracteristice în cromozomul 1 și cromozomul 17.

4. *Cartarea genetică umană, în plin progres de stabilire a sintenici și a ordinii locilor genici în cromozomi*. Metodele biochimice de determinare a expresiilor genice combinate cu metodele citogenetice și de hibridizare celulară au dat posibilitatea ca, împreună cu analizele clasice de lincaj prin studiul transmisiilor familiale, să se stabilească sintenia cromozomală pentru un număr remarcabil de loci. Deoarece metodele de vîrf în cartarea genetică, mai ales cele legate de hibridizările somatice, sînt destul de recente, îmbogățirea grupelor sintenice de cromozomi umani are o evoluție extrem de rapidă, încît un catalog al sinteniei întocmit la un moment dat este depășit în cîteva luni sau un an. În tabelul 14 se redau sinteniile stabilite pînă în 1977. Aceste date se sprijină pe următoarele metode de cartare genetică, la om: 1) Segregarea și asortarea markerilor genetici urmărite prin studii familiale (notate în tabel cu F). Au fost urmăriți în majoritate markeri biochimici; 2) Segregarea markerilor celulari în hibridizările somatice (S); 3) Aberațiile cromozomale și schimbările de trăsături marker (Ac); 4) Hibridizări ARN-ADN sau ADNc-ADN *in situ* (H); 5) Deducția lincajului din secvența aminoacidică a unor proteine anormale (P); 6) Producția de modificări cromozomale sub acțiunea adenovirusului 12 (V); 7) Combinarea diferitelor metode. Considerînd că în 1970 despre sintenie și cartare cromozomală în autozomii umani nu se

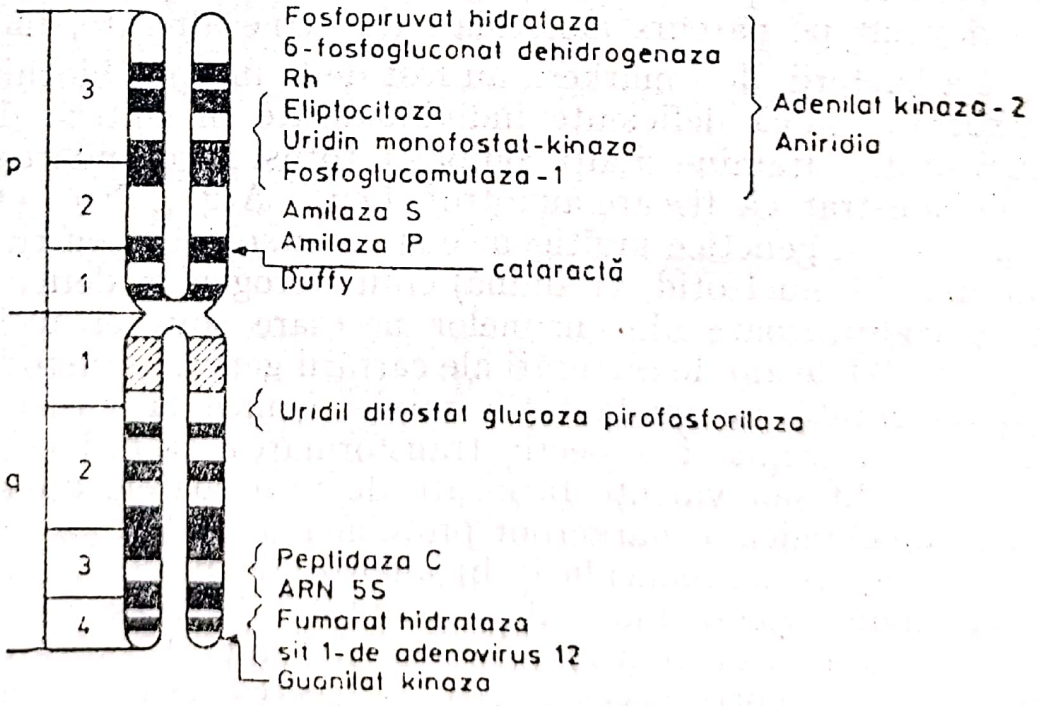


Fig. 97. Autozomul no. 1 uman cu o parte din markerii sintenici și cartare fizică provizorie în funcție de centromer și benzile de tip G.

puteau afirma decît cîteva lincaje neînregistrate cromozomal, tabelul 14 are calitatea să indice rapiditatea remarcabilă cu care au progresat cartările genetice la om și contribuția progresiv mai mare a studiilor moleculare pentru cartări (fig. 97). Cartările cromozomale la alte eucariote superioare (*Drosophila*, șoarece, porumb), ca și la eucariotele inferioare (*Neurospora*, *Aspergillus*, *Chlamydomonas*) au atins nivele superioare celor de la om. Trei motive însă au determinat descrierea realizărilor în cartarea genomului uman : a) analizele genetice umane sînt handicapate de imposibilitatea experiențelor sistematice de împerecheri planificate și selecție de markeri, ceea ce a determinat dezvoltarea metodelor de cartare parasexuală (hibridizări somatice, hibridizări moleculare) ; b) progresele efectuate de genetica umană în domeniul molecular sînt mai mari în ultimul timp ; c) interesul inegalabil pe care omul este firesc să-l aibă față de sine însuși.

3. Aspectele moleculare ale cartării genetice la virusuri și bacterii. Genoamele virale și bacteriene sînt monocromozomale și în consecință fiecare genom corespunde la un singur grup de lincaj. Moleculele de ADN corespunzătoare genoamelor (cap. VI) într-un raport biunivoc au ajuns să fie bine cunoscute în privința parametrilor fizico-chimici iar progresele de secvențiere nucleotidică a ADN au permis stabilirea secvențelor nucleotidice totale pentru genomul bacteriofagului Φ *X* 174 și genomul de SV40.

Markerii genetici ai virusurilor, la început macrostructurali (diferențe în spectrele de gazde testate prin formarea sau lipsa de formare a plajelor, sau prin forma plajelor — clare, opace, mari, mici etc.), au devenit pe parcurs moleculari (proteine alterate, incomplete).

La bacterii, deși markerii au fost de la început biochimici (markeri auxotrofi, adică deficiențe individualizate în sinteza de aminoacizi, nucleotide, vitamine și alți compuși), totuși aprofundarea auxotrofiilor a demonstrat că fiecare auxotrof (Leu$^-$, Arg$^-$, Trp$^-$ etc). marca de fapt regiuni genetice multigenice și că auxotrofii pentru același factor (aminoacid, nucleotid, vitamină) erau eterogeni și deficitari în diferite gene codificatoare ale enzimelor necesare sintezei acelui factor. În cursul a 30 de ani de cercetări ale cartării genetice, metodologia inițială fundamentată pe modalitățile mixiei genice la virusuri și bacterii (infecția multiplă și respectiv transformarea, transducția, conjugarea) au dobîndit noi valențe furnizate de următoarele direcții : a) detectarea biochimică a markerilor proteinici și studiul lor amănunțit pînă la secvențiere aminoacidică; b) analize ale mărimii unui locus genic prin studii fizico-chimice ale segmentului de ADN care-i corespunde, cît și prin analiza unui mare număr de mutanți purtători de markeri punctiformi pentru aceeași genă ; c) găsirea de noi tehnici de cartare fie prin combinarea modalităților clasice de transfer, fie prin mutageneză standardizată în celule sincronizate.

Scanned with OKEN Scanner

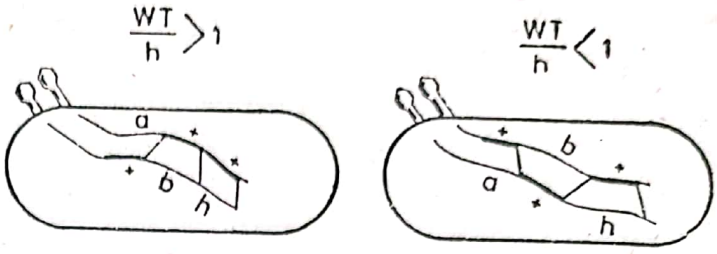


Fig. 98. **Testul de trei factori în infecția mixtă a bacteriei gazdă cu doi fagi mutanți pentru genele a, b, h.** Primul fag este monomutant fie a, + + fie b, + +, al doilea este mutant dublu b, h, + respectiv a, h, +. Markerul h este luat ca referință pentru stabilirea poziției de lincaj din cele două eventualități posibile: fie abh, fie bah.

1. *Cartarea genetică la bacteriofagi.* Infecția mixtă cu bacteriofagi omologi purtători de markeri diferiți are ca rezultat existența în aceeași citoplasmă a două molecule heterozigote de ADN genetic omoloage și apte de recombinare (fig. 98). Astfel de infecții mixte au drept consecință interschimburi de fragmente de ADN prin *crossing-over* consecutiv unui heteroduplex (cap. XI) iar analiza interschimbului genetic se efectuează prin numărarea frecvențelor de bacteriofagi recombinanți rezultați din infecția mixtă, în cadrul testelor clasice de doi și trei factori. Frecvența de recombinare la bacteriofagi pe unitatea de lungime a ADN este mai mare, aceasta reflectînd o mai mare eficiență în împerecherea moleculară (Mosig, 1970). Cartarea genoamelor fagice s-a desprins însă de clasicismul analizelor genetice obișnuite, prin descrierea mutanților condiționat letali care au permis fie analizele de interconectare intergenică, fie analize fine de structură intragenică. Mutanții condiționat letali sînt acei bacteriofagi mutanți rezultați din tipul sălbatic, deosebiți de ultimii prin aceea că multiplicarea lor are loc numai în anumite condiții, denumite permisive, și nu se produce în alte condiții, denumite restrictive. Tipurile sălbatice, contrar descendenților lor condiționat letali, se multiplică în ambele condiții, și permisive și restrictive.

a) *Mutanții condiționat letali de bacteriofagi.* În conformitate cu condițiile permisive și restrictive, aceștia se împart în trei clase majore stabilite la bacteriofagul T4, dar care au corespondențe și la ceilalți bacteriofagi.

— *Mutanții rII* (*rapid lysis*). Au fost descriși sub această denumire la fagul T4. Condiția permisivă este capacitatea de a crește pe *E. coli* B pe care dă liză rapidă și plaje mari (*coli* B este gazda permisivă) iar condiția restrictivă este incapacitatea de a se multiplica în celulele de *E. coli* K lizogenă pentru fagλ [K(λ)]. Fagul de tip sălbatic din care sînt obținuți crește pe ambele tulpini. Incapacitatea de creștere pe K(λ) se manifestă prin faptul că deși fagul mutant rII injectează ADN în celulă, acesta nu se replică, produsul rII alterat întîrzie replicarea. Această blocare are loc numai în prezența unui produs al genei *rex* din genomul integrat al profagului λ. Regiunea genetică rII a fost abordată într-un mare volum de experiențe care au dus la noțiunea de cistron (se va descrie mai departe).

Scanned with OKEN Scanner

— *Mutanții termosensibili*. Descriși la toate categoriile de bacteriofagi, plasmide, procariote și eucariote. Condiția permisivă constă în capacitatea de a se multiplica în celula gazdă la 25—30° iar condiția restrictivă constă în imposibilitatea de a se multiplica la 42°. Sînt simbolizați *ts* (engl. *temperature sensitive*) și sensibilitatea termică se datorează faptului că evenimentul mutațional alterează una din proteinele necesare multiplicării și dezvoltării fagului, alterarea manifestîndu-se prin incapacitatea acesteia de a-și mai exercita funcția la 42°. Mutația îi restrînge spectrul de valori termice active. Astfel de mutații pot viza oricare proteină necesară ciclului evolutiv al bacteriofagului și depinde de gena sediu al evenimentului mutațional: mutația *ts* în gena pentru proteinele de înveliș al capului le face pe acestea inapte de a reconstitui capside normale la 42°; mutația *ts* în gena pentru ADN-polimerază determină ca aceasta să nu poată sintetiza ADN la 42°; mutația *ts* în gena pentru lizozim fagic duce la codificarea unui lizozim incapabil să lizeze bacteriile la 42° etc. Astfel s-au obținut o serie de mutanți *ts* care interesează majoritatea funcțiilor vegetative ale bacteriofagului (ligaze, exonucleaze, proteinele cozii, fibrilele cozii, proteine de col fagic, proteine reglatoare, proteine recombinogene).

— *Mutanții amber sau supresor sensibili* (*am* sau *sus*). Mai întîi au fost descriși la bacteriofagul T4, iar apoi au fost descoperiți la majoritatea fagilor cercetați. Au fost observați într-un sistem permisiv-restrictiv de gazde prin faptul că se multiplică pe *E.coli* CR63 (gazdă permisivă) și nu cresc pe *E.coli* B (gazdă restrictivă). Acești mutanți sînt derivați printr-un eveniment mutațional care produce un codon nonsens dintr-un codon cu sens și are ca efect terminarea prematură a lanțului polipeptidic codificat de gena interesată în mutație. Numeroși codoni corespunzători la mulți aminoacizi comuni pot, printr-o singură schimbare mutațională, să dea naștere la codoni terminatori fie prin tranziție, fie prin transversie. Gazda permisivă produce un ARNt (clasicul $ARNt^{Tir}$ s) care, deși specifică un aminoacid, are un anticodon complementar codonului terminator. Prin acesta permite depășirea codonului terminator mutațional și sinteza unei proteine întregi. Mutația amber produce terminatorul UAG, denumit și codonul amber (denumirea amintește numele unui student, Bernstein, care a cooperat la descoperirea primului mutant, numele acestuia însemnînd piatră de chihlimbar, sau *amber* în engleză). Deoarece gazda permisivă anulează exprimarea mutației amber (producerea de polipeptide incomplete) printr-o genă particulară, relația aceasta a fost încadrată și descrisă ca unul dintre mecanismele fenomenului general de supresie. De aceea mutanții de tip *amber* de la fagul λ au fost numiți supresor-senzitivi sau *sus*. Mai tîrziu s-a demonstrat că astfel de mutații pot produce, depinzînd de codonul interesat și felul schimbării, oricare din cei trei codoni terminatori, iar efectul fenotipic este același, adică sinteza de polipeptide incomplete și inapte de a exercita

Scanned with OKEN Scanner

funcțiile proteinei genetic omoloage. Pentru fiecare tip de codon terminator s-a găsit și un ARNt supresor obținut prin mutații paralele ale gazdelor. Ca și în cazul mutanților *ts* s-au izolat mutanți *amber* diferiți cu afectarea prin terminare precoce a diferite proteine esențiale pentru ciclul evolutiv.

b) *Utilizarea fie a mutanților* **ts** *diferiți, fie a mutanților de tip* **amber,** *în teste de recombinare de doi sau trei factori.* Prin aceasta s-a putut stabili lincajul diferitelor gene marcate prin markeri corespunzători alcătuindu-se hărțile genetice ale fagului T4, fagului λ (fig. 99 și 100), cît și ale altor fagi. Aplicarea succesivă a testelor de trei factori cu suprapuneri de markeri a permis alcătuirea lincajului general. De

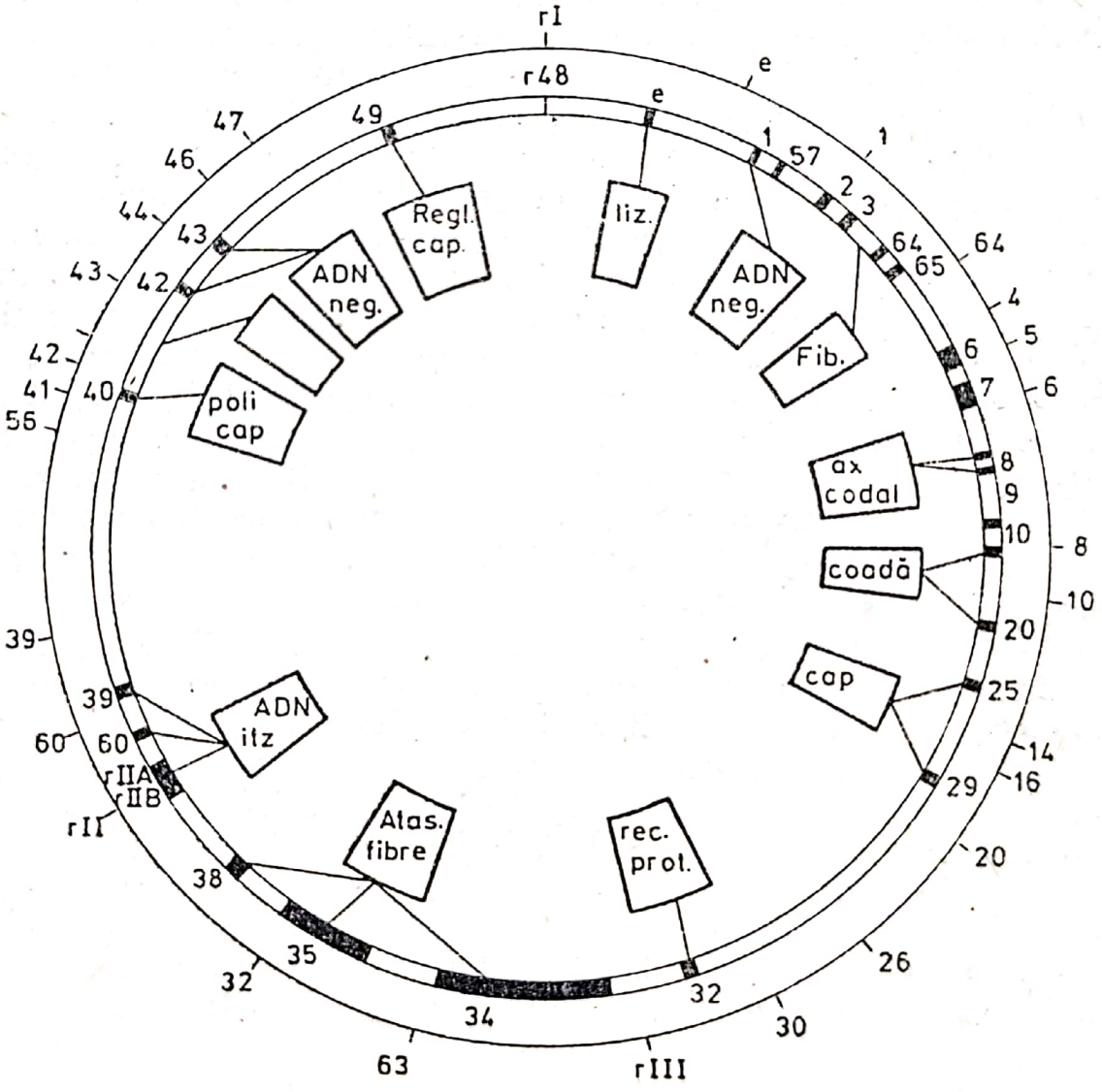


Fig. 99. **Harta genică a fagului T4 schițată de Mosig (1970) și redată simplificat.** Harta interioară arată funcțiile genelor și distanța în hartă (liz = producerea de lizozim; fib = fibrilele cozii; rec. prot = proteina recombinogenă 32; poli cap = gena codificatoare de factor limitat al mărimii capului). ADN neg. = gene producătoare de factori reglatori ai sintezei de ADN; ADN itz. = gene al căror defect produce întîrziere în sinteza ADN (rIIA, rIIB, 60, 39).

Scanned with OKEN Scanner

exemplu, dacă se consideră o serie de markeri *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f* pentru analiză genetică, sînt testaţi întîi markerii *a*, *b*, *c* şi li se demonstrează lincajul apoi se testează *b*, *c* şi *d* apoi *c*, *d* şi *e* sau *a*, *b* şi *e* etc. pînă se stabilesc modalităţile de lincaj. Prin aceste teste de lincaj general s-a dovedit că harta genetică a fagului T4 nu are extremităţi, nu este liniară, ci circulară (fig. 99).

c) *Complementarea, cartarea genetică fină* şi *testul cis-trans*. Adiacenţa de markeri a fost dovedită şi prin testele de complementare care s-au bazat pe următoarea constatare iniţială. Infecţia mixtă a unei gazde cu doi mutanţi *ts* diferiţi şi incubarea la temperatura restrictivă permit multiplicarea şi producerea de fagi maturi, deşi fagii multiplicaţi şi eliberaţi prin liză nu sînt recombinanţi. Populaţia de progeni din infecţia mixtă este formată dintr-un amestec de fagi cu aceleaşi schimbări mutaţionale *ts* iniţiale. Această situaţie se datorează complementării reciproce a doi fagi alteraţi mutaţional. De exemplu, un mutant *ts* produce proteine capsidice anormale şi cozi normale iar un alt mutant *ts* produce proteine capsidice normale şi cozi anormale. În infecţia mixtă cele două genoame se suplinesc complementîndu-şi funcţiile, capsidele normale produse de unul dintre fagi şi cozile normale produse de celălalt încorporînd cu probabilitatea 1/2 cînd un genom, cînd celălalt şi asigurînd formarea de fagi maturi pentru ambele categorii. Acelaşi fenomen de complementare s-a observat şi în cazul mutanţilor *amber*. Complementarea a putut fi obţinută şi *in vitro* cu omogenate bacteriene de la bacterii gazdă infectate separat. Efectuarea testelor de complementare cu mai mulţi mutanţi a dus la constatarea că aceştia se împart în clase sau grupe de complementare a căror configuraţie este asemănătoare cu a grupelor de lincaj constatate prin recombinare.

Analizele fine genetice se referă la cartografierea intragenică a segmentelor de genă din ce în ce mai mici pînă la mărimea unei perechi nucleotidice. Aceste analize care conduc la suprapunerea genei cu structura ei moleculară au materializat reprezentarea cartografică a locilor genici ca distanţe de hartă genetică, deoarece hărţile genetice ale grupelor de lincaj consideră locii la modul abstractizat ca puncte nedimensionate din harta genică (fig. 99 şi 102). Prima disecţie a unei regiuni genetice considerată la un moment dat ca genă unitară a vizat regiunea rII a fagului T4 şi a fost efectuată de Benzer (1959, 1961). Izolînd aproximativ 2500 de mutanţi rII separaţi şi analizîndu-i prin infecţii mixte, el a constatat că rezultă recombinanţi în care evenimentele de *cross-over* au loc intragenic iar mutanţii pot fi ordonaţi într-o hartă genetică a genei rII. Mai mult, prin infecţia mixtă cu perechi de mutanţi *rII* a bacteriilor gazdă nepermisive (*E. coli* K λ), a observat existenţa de mutanţi care se complementează în sensul că mutanţii din perechea mixtă de infecţie se suplinesc reciproc pentru a-şi asigura funcţia de multiplicare pe gazda nepermisivă. Prin infecţii mixte

Scanned with OKEN Scanner

în combinații diferite de cîte doi a observat că toți mutanții testați se împart în două clase de complementare, A și B, în care mutanții unei clase nu se complementează iar mutanții din clase separate se complementează (de exemplu, A1 + A3 sau B1 + B3 nu se complementează, pe cînd A1 + B3 sau B1 + A3 se complementează). Din aceste rezultate s-a tras concluzia că „gena *rII*" nu este o unitate de funcție, cum se credea, deoarece dacă ar fi o unitate (adică ar codifica un lanț polipeptidic unitar) nici o asociere de mutanți în infecții mixte nu ar putea să dea naștere la produși care să se complementeze. În realitate, gena *rII* este, de fapt, o regiune genetică formată din două unități funcționale separate, A și B, ai căror produși sînt derivați unitari de codificare (două lanțuri polipeptidice) iar în infecțiile mixte, fagi rIIA × fagi rIIB, primii produc factorul B normal și factorul A mutant (alterat) iar ultimii produc factorul A normal. Ambii factori normali, deși codificați de fagi separați, îndeplinesc întreaga funcție de tip sălbatic, adică posibilitatea de a crește pe gazda nepermisivă, cu alte cuvinte se complementează. Benzer a mai observat că în infecții mixte cu mutanți dubli (rezultați din recombinări A × B), indiferent în care asociație, aceștia nu au capacitatea să se complementeze. Adică atunci cînd alterările mutaționale A și B se găsesc pe același ADN (de aceeași parte în infecțiile mixte de două molecule), în poziție cis, complementarea nu are loc. Complementarea are loc numai cînd alterarea A se găsește într-un ADN fagic iar alterarea B în celălalt ADN fagic, cu alte cuvinte cînd cele două alterări sînt în poziție trans. Cele două tipuri de asocieri pentru testarea complementării, cis și trans, constituie ca urmare un test cis-trans de demonstrare a unității minime funcționale de codificare. Deoarece unitatea minimă de codificare se demonstrează prin testul cis-trans, ea a fost numită *cistron* iar gena își pierdea un caracter definitoriu — unitatea de funcție. Ca urmare, gena devenise o unitate nepotrivită, fiind înlocuită cu termenul de cistron.

d) *Complementarea intragenică, mecanism incongruent cu termenul de cistron pentru unitatea de funcție.* Noțiunea de cistron a fost introdusă potrivit concepției complementării. Aceasta afirmă că existența a cel puțin două grupe de complementare în cadrul unei funcții marker pentru o genă considerată unitară demonstrează neunitatea funcțională a genei respective. Caracterul definitoriu al cistronului, complementarea, prezintă însă excepții care, pe măsura observațiilor, pot deveni frecvente. Acestea sînt cazurile de complementare intragenică manifestată în cazul în care expresia unei gene este o proteină oligomerică formată din aceleași subunități. Prin complementare intragenică se înțelege capacitatea produselor a două alele mutant de a reconstitui cel puțin parțial funcția de tip sălbatic în condiția în care acestea se află împreună. De exemplu, o alelă *A* de tip sălbatic codifică un polipeptid A care pentru funcția finisată (activitate enzimatică)

Scanned with OKEN Scanner

se agregă într-un dimer $(A)_2$. Din alela de tip sălbatic derivă prin mutație două alele, a^1 și a^2, care codifică polipeptidele a^1 și respectiv a^2. Exprimate singular, cele două polipeptide formează proteine inactive, deoarece și dimerul $(a^1)_2$, și dimerul $(a^2)_2$ sînt inactivi. În schimb, dimerul a^1-a^2 produs de ambele alele aflate în aceeași celulă este activ și reconstituie funcția de tip sălbatic, adică cele două alele se complementează, deși se știe clar că produc fiecare numai cîte un lanț polipeptidic și ocupă același locus (sînt alele). Astfel de complementări intragenice au fost descrise la enzime bacteriene (Goodenough și Levine, 1974). Exemple de complementare intragenică oferă și hibridizările somatice la eucariote și om, stare funcțională care permite studiul complementării. De exemplu, fuziunile celulare ale unor tulpini derivate de la șapte subiecți cu galactozemie au demonstrat că o tulpină complementează în starea hibrid toate celelalte 6 tulpini. Celulele hibride produc o galactozil-transferă activă, dar diferită de tipul sălbatic prin cinetică enzimatică (Ringertz și Savage, 1976). La fel, liniile celulare HGPRT deficiente formează hibrizi activi, deși locusul genic HGPRT este unitar și produce un singur lanț polipeptidic.

De fapt, testul *cis-trans* al complementării este un moment de aprofundare în cunoașterea unității de funcție din genom, analog cu momentul în care s-a dovedit că un caracter complex luat ca marker pentru o genă unitară era eterogen, finisarea lui fiind datorită activității mai multor enzime, adică momentul conceptului o genă — o enzimă. În acel moment nu s-a făcut afirmația că gena nu mai este o unitate și nici nu a fost înlocuită cu un termen nou, de exemplu ,,enzimon'' sau ,,proteinon'' (cap. I). Ca urmare, testul *cist-trans* nu a infirmat noțiunea de genă ca unitate de funcție, ci, conform cu aprofundarea cunoașterii markerilor, unitatea de funcție denumită genă de clasici devine segmentul de ADN care determină un lanț polipeptidic. Această unitate de funcție poate fi dovedită în prezent în multe cazuri (dar nu în toate) prin experiențe *cis-trans* și în toate cazurile unde s-a încercat, prin transferul informațional ADN→ARN→ polipeptid. Ca urmare, entuziasmul de moment al unei descoperiri importante care a promovat termenul cistron în locul genei nu justifică folosirea lui în continuare, mai ales că nu este potrivit în multe situații (cap. I, VIII, IX), ca și în cazul complementării intragenice.

e) *Cartări exclusiv moleculare la fagii ARN lipsiți de recombinări.* S-au descris diverse tipuri de bacteriofagi al căror genom este format dintr-o moleculă de ARN monocatenar (cap. IV, VII, VIII) care codifică numai trei proteine: proteina A de invazie, proteina capsidică și replicaza (ARN-polimeraza). Acești fagi nu au un sistem enzimatic de recombinare propriu iar celulele gazdă nu produc enzime cu capacitatea de a fragmenta și repara ARN fagic. În acest caz cartarea celor trei loci corespunzători proteinelor virale specifice a fost efectuată prin metode exclusiv biochimice: 1) determinarea ordinii de producere

Scanned with OKEN Scanner

a proteinelor fagice în raport cu pătrunderea succesivă a ARN fagic în invazia celulei gazdă ; 2) secvențierea ARN fagic și proteinelor fagice și observarea corespondențelor de cod genetic. Prin aceste metode s-a demonstrat că ordinea locilor genici în genoamele fagilor ARN este următoarea :

$$5'\textit{telo-locus}\ pA\text{-}Sp_1\text{-locus}\ pC\text{-}Sp_2\text{-locus}\ \textit{Rep-telo-}3',$$

în care : *telo* = telosegmentele extremităților ; *pA* = proteina A de invazie ; *Sp* = segment spațiator cu rol în terminarea traducerii (cap. VIII) ; *pC* = proteina capsidică ; *Rep* = replicaza ; 5′ și 3′ semnifică cele două extremități ale moleculei de ARN, extremități care orientează și harta genetică demonstrată strict biochimic.

f) *Integrările genoamelor fagice în lizogenie, cartarea funcțiilor de integrare și grupările funcționale la fagul* λ. Pentru un număr mic de bacteriofagi, denumiți temperați, injectarea ADN fagic nu este urmată de multiplicarea fagului și de liză. Genomul acestor bacteriofagi este dotat cu capacitatea de a se integra printr-un proces de veritabilă recombinare cu cromozomul celulei gazdă în starea de profag (cap. X). Tulpina purtătoare de profag este lizogenă, deoarece fie spontan (cu o frecvență joasă), fie prin inducție cu un agent în general mutagen, eliberează fagi maturi capabili să lizeze alte tulpini. Pentru *E. coli* două tipuri de bacteriofagi s-au dovedit sigur capabili de lizogenie recombinativă, și anume fagul λ și fagul P_2. Analiza cartografică a fagului λ, efectuată mult mai amănunțit decît a altor fagi, a demonstrat existența unei întregi regiuni genetice situată central și formată din situl de atașare și genele codificatoare pentru integrare (fig. 100). De asemenea, o altă regiune genetică, denumită brațul drept, formată din gene conectate funcțiilor de recombinare (atît în integrarea bacteriană, cît și în recombinările interfagice), de replicare a ADN fagic și de reglare a transcrierii, și o ultimă regiune, brațul stîng, formată din genele codificatoare ale proteinelor capsidice și ale cozii. Aproximativ 50% din întregul genom, corespunzător părții centrale, este afectată numai atașării profagice și nu este esențială supraviețuirii și ciclului litic. Fagul λ mai are o caracteristică fizică. Genomul său liniar are extremități adezive complementare și are un ciclu evolutiv molecular, structură liniară ⇌ structură circulară închisă necovalent ⇌ structură circulară închisă covalent ⇌ structură liniară. În structura circulară toate genele ciclului litic devin grupate (genele pentru liză, genele pentru învelișul capului, genele cozii). Eliminarea prin deleții mutagene a acestei regiuni „vegetative" întinse care include și regiunea centrală (fig. 100) duce la formarea unei molecule circulare capabile de replicare, dar deficitară în lizogenie și în ciclul litic. Astfel de genoame numite lambdoide sînt asemănătoare plasmidelor (cap. XIII) și importante pentru manipularea genelor (cap. XIV).

Scanned with OKEN Scanner

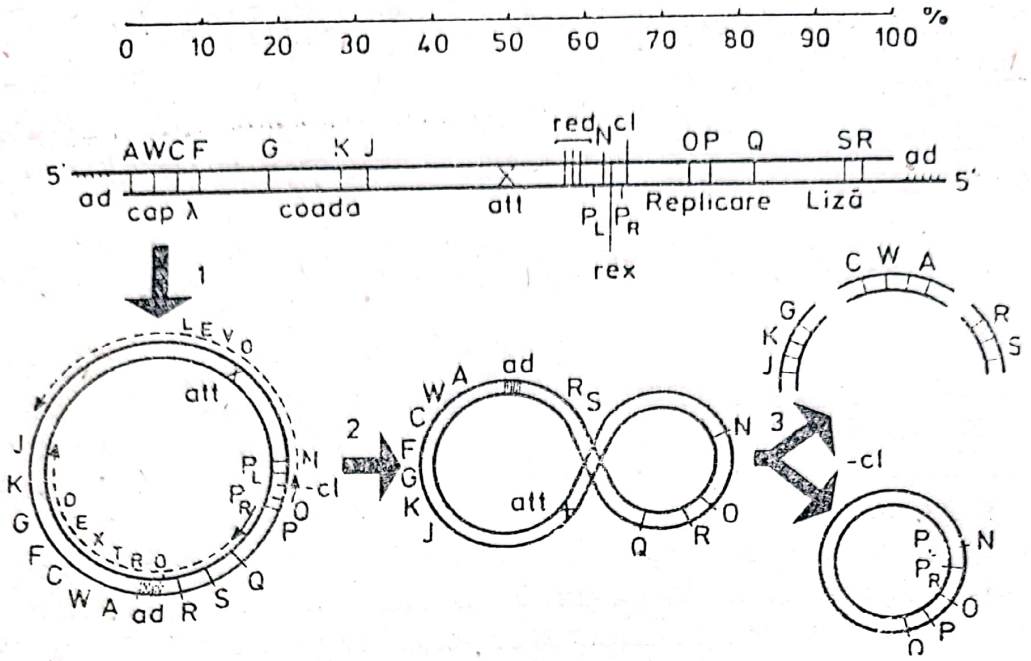


Fig. 100. **Harta genică a bacteriofagului v şi formarea de lambdoizi plasmidici prin deleţii.** Sus este genomul liniar ai căror loci genici sînt înscrişi în raport cu scala procentuală. ad = extremităţi monocatenare adezive; AWCF = gene care codifică proteinele capului; GKJ = gene care codifică proteinele cozii; S = genă producătoare a unui factor cerut pentru liză; R = gena pentru lizozim fagic; N şi Q = gene ale căror produse promovează transcrierea şi replicarea; OP = gene de replicare; cI = gena de represor; red = gene de recombinare (exo v, β, g); att = regiunea de ataşare şi integrare în cromozomul bacterian; P_L şi P_R = promotorii pentru levo şi dextrotranscriere; rex = gena producătoare de factor blocator al creşterii mutanţilor rII de fag T4 pe bacterii λ lizogene. 1 = circularizarea necovalentă şi apoi covalentă; 2 şi 3 reprezintă în rezumat deleţii multiple de gene care codifică funcţiile somatice (formarea capului, cozii, liza bacteriei), păstrînd într-un minigenom lambdoid numai genele necesare replicării. Lambdoidul este asemănător unui plasmid, nu lizează bacteriile, se multiplică în multe copii celulă şi este folosit ca vector în manipulare (capitolul XIV). Un mecanism analog are loc în producerea de miniplasmide.

2. *Cartarea genetică la bacterii.* Analiza genetică a bacteriilor s-a bazat de la început pe markeri biochimici, deoarece o parte majoră din caracterele definitorii ale diferitelor grupări taxonomice sînt biochimice şi fermentative. Ca şi la bacteriofagi, analizele de cartare genică s-au dezvoltat în două direcţii: înscrierea în harta genetică a locilor genici marcaţi prin diferenţe marker; analiza fină intragenică a unui mare număr de mutanţi punctiformi, purtători de markeri corespunzători la fragmente de genă din ce în ce mai mici pînă la o pereche nucleotidică.

a) *Markerii bacterieni indicatori de loci genici.* Locii genici de cartat în harta genetică sînt definiţi prin markeri purtaţi de diferiţi mutanţi bacterieni fie spontani, fie induşi cu agenţi mutageni, izolaţi de-a lungul a zeci de ani prin tehnici devenite clasice. Markerii folosiţi pentru cartare au fost progresiv clarificaţi, în aşa fel ca fiecare să definească o genă (sau locus) conform corespondenţei actuale o genă

Scanned with OKEN Scanner

— un lanț polipeptidic și numai în cazurile în care caracterul marker nu a permis această clarificare, datorită neelucidării biochimice, el s-a păstrat ca atare. De exemplu, acum 20 de ani pentru sinteza nucleotidelor purinice se descria un singur marker pentru sinteza nucleotidului adenilic și un singur locus corespunzător, locusul *ade*. În prezent se cunosc cel puțin 9 markeri pentru tot atîția loci genici codificatori ai enzimelor sintetizatoare ale nucleotidului adenilic (Bachmann și colab., 1976). În schimb, sînt markeri care se referă la un defect morfologic neclarificat biochimic; de exemplu, markerul *qmE* de *E. coli* care se manifestă la mutantul purtător ca un defect de membrană biochimic nespecificat, transmisibil ereditar, și indică un locus genic. Acesta mai tîrziu poate va deveni o regiune genetică formată din mai mulți loci, așa cum s-a demonstrat și pentru „locusul" *ade*. Analizele de cartografie s-au bazat pe cele trei modalități principale de transfer genetic interbacterian descrise clasic, transformarea, transducția și conjugarea, modalități care permit recombinări și au dat posibilitatea să se ajungă la sisteme variate de model experimental. Pînă în prezent s-au inițiat analize de cartografiere la peste 25 de genuri din diferite familii ale ordinului Eubacteriales, dar hărțile cele mai amănunțite și bine controlate prin verificări reciproce cu tehnici diverse sînt construite la *E. coli*, *Salmonella*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas*. La *E. coli*, de exemplu, sînt cartografiați peste 650 de markeri diferiți, ceea ce constituie analiza a aproximativ 30% din markerii teoretic posibili ai genomului de *E. coli*.

b) *Diferite metode de cartografiere generală și segmentară*. Metodele cartografierii genetice la bacterii se împart în: metode orientative, cu ajutorul cărora un număr limitat de regiuni marcate prin markeri bine definiți jalonează harta genetică generală; metode de analiză secvențială segmentară care completează, verifică, recalibrează hărțile genetice și permit analiza genetică fină, subgenică.

Metodele cartării orientative a ansamblului unei hărți genetice bacteriene. Aceste metode sînt dinamice și se bazează pe un factor comun, dinamica replicării ADN. Totodată, ele se caracterizează prin faptul că nu pot realiza o analiză fină de lincaj intergenic, ci mai mult între regiuni genetice. Sînt trei metode: împerecherile întrerupte în procesul conjugării; analiza frecvenței markerilor prin întreruperea replicării în celule sincronizate și transformare; analiza frecvenței de inducție a markerilor cu ajutorul nitrozoguanidinei la bacteriile în creștere sincronă sau nesincronă. 1) *Întreruperea transferului prin conjugare la* **E. coli**, *poziția de cartografiere exprimată în minute de transfer*. Cu mulți ani în urmă s-a dovedit că plasmidul F (de *f*ertilitate) are capacitatea să se integreze liniar în cromozomul bacterian și prin aceasta să crească de sute de ori capacitatea tulpinii de a transfera gene bacteriilor F^-, motiv pentru care tulpina donoare „masculă" a fost numită Hfr (engl. *high frequency of recombination*). După nume-

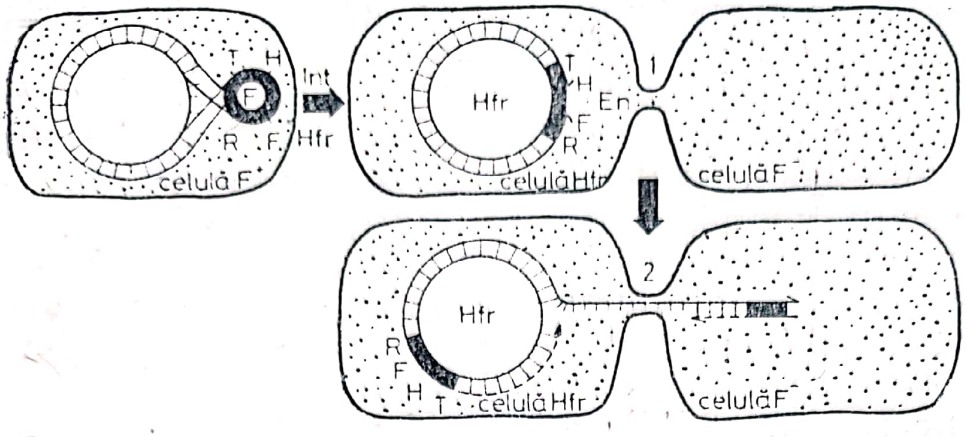


Fig. 101. Formarea unei tulpini Hfr prin integrarea plasmidului F în cromozomul bacterian al celulei F. Împerecherea Hfr × F și transferul unei monocatene simultan cu replicarea de tip inel rotator. 1 — împerechere Hfr × F⁻ ; 2 — transfer genetic Hfr→F⁻.

roase dispute s-a precizat că transferul are loc astfel. Endonucleaza de replicare produce o incizie monocatenară la nivelul factorului F integrat (fig. 101). O extremitate a crestăturii se mobilizează spre puntea de conjugare, iar concomitent acestei migrări, catena indemnă este folosită ca matriță pentru o replicare cu direcția spre catena care migrează progresiv și a cărei desfășurare este catalizată de enzima rotatorie ATP dependentă (cap. III). Imediat ce catena migratoare a pătruns în celula F⁻ acceptoare, servește ca matriță pentru sinteză de ADN, și astfel monocatenă transferată este rapid convertită în bicatenă. Transferul unui cromozom întreg la temperatura de 30° are loc în 100 de minute cu o viteză de aproximativ 20 000 de baze (sau 20 kilobaze) pe minut. Prin mijloace fizice (agitare puternică) sau alte mijloace, transferul se întrerupe prin ruperea punții de conjugare și, bineînțeles, și a catenei de transfer. Dacă dintr-o mixtură de conjugare se iau eșantioane la intervale scurte de timp agitîndu-se puternic (peste 10^4 lovituri/min), atunci se permite un control al lungimii segmentelor transferate. Segmentele transferate se găsesc împreună cu genomul gazdei F⁻ cu care intră în *crossing-over* la nivelul regiunii genetic omoloage. Tulpinile angajate în transfer au diferențe marker cu ajutorul cărora se observă recombinanții formați. La fiecare eșantion se caută prezența recombinanților printr-un test de „da sau nu", fără a măsura frecvența recombinanților, deoarece prezența recombinanților indică segmentul care a intrat. Astfel se stabilește o hartă genetică exprimată în minute de transfer. Datorită faptului că transferul este rapid (aproximativ o genă de 350 nucleotide/s) întreruperile nu pot aprecia decît distanțe de mai multe gene. 2) *Analiza lincajului general prin raportarea frecvenței de transformare la replicarea cromozomului bacterian.* A fost aplicată la *Bacillus subtilis* începînd cu experiențele lui Yoshikawa și Sueoka din 1963. Metoda se bazează pe un principiu conectat la proprietățile replicării. Repli-

Scanned with OKEN Scanner

carea cromozomului bacterian începe din aceeași regiune, denumită origine (cap. III), se continuă ca un punct de replicare pînă la o regiune terminus și durează 40—100 de minute. În timpul acestei reacții, genele se dublează progresiv de la origine spre terminus. Datorită ritmului bacterian de creștere, ciclurile celulare sînt formate mai mult din faza S (G_1, G_2 și D sînt, ca durată, neglijabile) și atunci într-o cultură în creștere, practic tot timpul genele de origine vor fi dublate față de genele terminus. Genele intermediare se găsesc într-un gradient descrescător de raporturi între 2 și 1 față de aceleași gene terminus. Acest principiu a fost testat prin transformare genetică în care bacteriile acceptoare erau auxotrofi diverși (deficienți în sinteza de nucleotide și aminoacizi), iar bacteria donoare, un prototrof. Cercetîndu-se frecvența transformanților pentru diverși markeri s-a constatat că totdeauna markerii purinici au o frecvență dublă față de markerii metioninici iar ceilalți markeri au raporturi intermediare de frecvență față de ultimii, înșiruite între 2 și 1. Raporturile de frecvență a transformanților se explică prin cantitatea de segmente genice capabile de transformare: genele de origine sînt totdeauna dublate și segmentele lor de ADN dau o frecvență de transformare de două ori mai mare decît segmentele de ADN ai locilor terminus. Gradientul descrescător pentru ceilalți markeri intermediari se explică pe baza probabilității ca momentul extracției să-i surprindă fie dublați, fie simpli: cu cît un marker este mai îndepărtat de locii de origine, cu atît probabilitatea de a fi replicat (și dublat) este mai mică. Acest gradient descrescător de frecvență de transformare înscris într-un grafic liniar proporțional cu raporturile de frecvență constituie o hartă genetică. Metoda a fost privită la început cu scepticism, dar apoi experiențe efectuate pe culturi bacteriene cu replicare sincronizată, cît și analizele genetice segmentare au demonstrat valabilitatea ei. 3) *Analiza lincajului genic orientativ prin mutageneză.* Luînd ca interpretare de bază același criteriu al replicării ordonate caracteristice genomului unicromozomal bacterian, Altenbern (1971, 1973) a considerat că și mutageneza cu un mutagen standardizat permite cartografierea fără a mai fi necesar vreun transfer genetic. Principiul cartografierii prin mutageneză se sprijină de fapt pe teoria țintei în care se afirmă că reacția mutagen-genă este ca lovitura „proiectilului într-o țintă" și că frecvența mutațiilor induse de un mutagen este direct proporțională cu mărimea genei (sau numărului de gene) testate pentru o schimbare mutațională dată. Astfel, frecvența de mutație a diverselor gene dintr-un cromozom este diferită în raport cu probabilitatea de a fi duble sau simple în timpul replicării. Gena de origine are o frecvență mutațională dublă față de genele terminus iar frecvențele mutaționale pentru genele intermediare vor fi cu atît mai scăzute și mai apropiate de valoarea genelor terminale, cu cît cele intermediare sînt mai depărtate de gena de origine. Pe baza acestui princi-

Scanned with OKEN Scanner

piu, Altenbern a utilizat ca bacterii de analiză stafilococii și mutageneza cu nitrozoguanidină, un mutagen chimic cu efect de tip alkilant, fără specificități de baze azotate (deși se susține că ar avea afinitate mai mare pentru G). În această mutageneză a urmărit mutația spre auxotrofie pentru un număr de aminoacizi și vitamine. Calculînd frecvența mutațiilor, a constatat un gradient de frecvențe mutaționale care a permis o înscriere liniară în hartă a markerilor folosiți. Metoda a fost utilizată și la *Brucella* și prezintă marele avantaj că este total parasexuată (nu necesită schimb genetic recombinativ), motiv pentru care poate fi utilizată la oricare bacterie, mai ales la numeroasele bacterii care nu au transfer genetic.

Metodele de analiză secvențială segmentară a cromozomului bacterian. Aceste metode se bazează pe analiza concretă a unui segment de cromozom purtător a doi sau trei markeri într-un experiment dat și numai asamblarea datelor obținute în diferite experiențe și în diverse laboratoare pot furniza harta genetică de ansamblu. Metodele se sprijină direct pe evenimente de recombinare și analiză numerică a recombinanților și sînt după cum urmează. 1) *Cotransformarea și analiza ordinii de lincaj prin teste de trei factori.* Cotransformarea sau transformarea îmbinată constă din integrarea simultană a doi sau trei markeri marcatori de gene diferite, cu o frecvență destul de ridicată, fapt care indică interconectarea genelor într-un singur segment și adiacența lor. În general, ADN donor este extras de la o tulpină de tip sălbatic iar tulpina acceptoare este purtătoare de markeri. De exemplu, transformarea la *B. subtilis* a unei tulpini biauxotrofe triptofan dependente și histidin dependente ($try^-his_2^-$) cu ADN de la o tulpină donor try^+his^+. O frecvență de transformanți mai mare decît 10^{-4} indică îmbinarea celor doi markeri. Acești markeri sînt analizați apoi prin teste de trei factori în care markerul his este luat ca factor de referință iar diferiți markeri try sînt analizați față de markerul referent. Analiza lincajului prin cotransformare și testul de trei factori mai este denumită transformare cantitativă și a permis stabilirea de hărți genetice la *B. subtilis*, *Pneumococcus* și *Haemophilus*. 2) *Transducția generalizată și cotransducția.* Este mecanismul binecunoscut al transferului de segmente de cromozom de la o bacterie donoare la o bacterie acceptoare prin intermediul bacteriofagilor ca purtători. Se bazează pe încorporarea întîmplătoare în sacul capsidic al fagilor, spre sfîrșitul ciclului litic, de segmente de ADN al bacteriei pe cale de liză (bacteria donoare) la care cromozomul bacterian se fragmentează degradativ. În momentul infectării altor celule (cele acceptoare) fagul purtător injectează, pe lîngă propriul ADN, și segmentele cromozomului donor, realizîndu-se prin aceasta o stare de eterogenot asemănătoare transferului prin conjugare. Fragmentele testate se pot angaja în recombinare cu cromozomul celulei acceptoare prin *crossing-over* nereciproc și pot fi integrate în regiunea omoloagă. Sînt cîțiva bacterio-

Scanned with OKEN Scanner

fagi utilizați cu precădere în transducția generalizată : fagul P1 pentru *E. coli*, fagul P22 pentru *Salmonella*, fagii PBS1, PP10 și SP10 pentru *B. subtilis*, unii bacteriofagi pentru stafilococ, fagul pf16 pentru *Pseudomonas putida*. Fiecare fag transductant are probabilitatea de 10^{-5} — 10^{-6} să încorporeze oricare segment de ADN și ca urmare poate transfera cu această frecvență oricare genă de la bacteria donoare la cea acceptoare. De aceea transducția se numește generalizată (vizează toate segmentele de cromozom). Fragmentul transdus are mărimi variabile și poate cuprinde o genă sau mai multe gene. Cînd segmentul transdus cuprinde mai multe gene, aceasta se traduce prin producerea de transductanți în care s-au integrat simultan mai mulți loci genici și se numește cotransducție. Cotransducția semnifică lincajul genetic al locilor cotransduși. Cotransducția permite analize genetice ale ordinii de lincaj prin testul de trei factori și poate cuprinde uneori regiuni genetice marcate de 6—8 markeri genici. Reunificarea datelor analitice obținute prin cotransducții diverse permite stabilirea unui lincaj care să cuprindă majoritatea locilor genici cunoscuți. 3) *Transducția abortivă*. Este un derivat al transducției generalizate în care fragmentul genetic, deși transferat, nu este și integrat în celula acceptoare. Acesta însă își păstrează capacitatea de expresie genică (își codifică proteinele specifice), dar obișnuit nu-și poate asigura și replicarea. Uneori bacteriofagii transductori pot încorpora și transfera genoame plasmidice (cap. XIII). Expresia genică în transducția abortivă de segmente nerepliconice permite manifestarea unei trăsături marker (producerea unei enzime) în condiția de heterozigot parțial, dar pentru un număr limitat de bacterii, deoarece absența replicării duce la „diluția" expresiei genice prin diviziuni celulare. Totuși în multe condiții, expresia genică este îndeajuns de amplă pentru a putea fi observată (de exemplu, producerea unei cantități mari de enzimă care este distribuită pentru cîteva generații, deși fragmentul transdus rămîne într-o singură celulă; producerea de factori difuzibili, ca aminoacizi, vitamine, care suplinesc multiplicarea locală și a bacteriilor netransduse). Transducția abortivă a fost utilizată pentru studiul complementării prin teste *cis—trans* prin care s-au subdivizat regiuni genetice mari în loci genici corespunzători raportului o genă—un lanț polipeptidic. 4) *Transducția specializată și sexducția sau F-ducția*. Sînt două mecanisme de transfer asemănătoare prin faptul că genele transferate sînt totdeauna aceleași și au comportări asemănătoare pentru scopul cartării. Transducția specializată este datorată fagilor lizogeni și constă din transferul unei regiuni genetice caracteristice pentru fiecare fag transductibil, fapt care-i justifică numele de transducție specializată. Specializarea pentru transducția numai a unei regiuni genetice se explică prin mecanismul de captare a fragmentului cromozomal bacterian. În momentul cînd profagul este indus spre a se desprinde din cromozomul care l-a integrat,

Scanned with OKEN Scanner

procesul de incizie se produce eronat cu o frecvență de 10^{-5}—10^{-6} din totalul inducțiilor și desprinde, odată cu genomul fagului, și un segment vecin sitului de integrare fagică. Segmentul de ADN rămîne integrat în genomul de bacteriofag, ca urmare face parte din repliconul fagic și este transferat ca atare la o altă bacterie infectată cu un astfel de fag. Fragmentul transferat este în acest caz capabil de expresie genică, de replicare și de recombinare la nivelul locilor omologi din celula gazdă. Exemple de fagi capabili de transducție specializată sînt fagii λ purtători ai operonului *gal* (λ gal) sau purtători ai genelor pentru sinteza biotinei (bio A, B, C, D, F, H, P) (Bachmann și colab., 1976). La fel sînt și fagii φ 80 purtători ai operonului pentru sinteza triptofanului la *E. coli*, sau cei purtători ai operonului lac printr-o recombinare de sit pentru fagul φ 80 cu operonul lac. Sexducția este un transfer interbacterian prin conjugare a unui factor F care a trecut din starea integrată de la o tulpină Hfr, în stare autonomă, trecere care a antrenat prin desprindere eronată și segmente vecine sitului de atașare. Aceste segmente cuprind gene bacteriene care rămîn în continuare integrate în repliconul factorului F denumit în această ipostază F′ (F prim). Datorită numeroaselor situri de atașare a factorilor F, se cunosc și diverse tipuri de F′ diferențiate între ele prin genele bacteriene care le poartă. Segmentele integrate (de exemplu, operonul lac în cazul lui F′ lac, operonul gal în cazul lui F′ gal) și transferate prin conjugare la o bacterie acceptoare, ca și în cazul transducției specializate, au expresie genică, se replică în sistemul repliconic al factorului F, se transmit în succesiunea de generații și se pot recombina la nivelul regiunilor omoloage cu cromozomul celulei acceptoare. Transducția specializată și sexducția sînt utilizate în cartare fie prin teste de complementare de tip *cis-trans*, deoarece constituie stări eterogenot stabile, fie prin analiza recombinărilor. 5) *Analiza delețiilor bacteriene rezultate din educție.* Prin educție se înțelege deleția unei regiuni genetice din cromozomul bacterian, antrenată de un profag lizogen, sau a altor repliconi integrați, din care rezultă bacterii deficitare în funcțiile codificate de segmentele desprinse. Bacteriile deficitare se numesc *eductanți*. De exemplu, *E. coli* K—12 prototrofică și lizogenă pentru fagul P2 (al cărui sit profagic este vecin regiunii *his*) segregă cu o frecvență joasă eductanți auxotrofi *his*$^-$. Acești eductanți pot conține deleții întinse care să cuprindă întregul operon *his* și gene adiacente acestuia, deoarece nu au retromutații ca mutanții punctiformi *his*$^-$ și cresc mai lent decît ultimii. Eductanții sînt, de fapt, supraviețuitori ai inducțiilor de lizogenie, evenimente care pot altera capacitățile litice ale bacteriofagului și reprezintă atributul negativ al evenimentului de formare al unui fag cu transducție specializată. Deoarece fagul P2 are mai multe situri de atașare în cromozomul de *E. coli*, delețiile diverșilor eductanți au contribuit la precizarea și verificarea hărții genetice (Sunshine și Kelly, 1971).

Scanned with OKEN Scanner

6) *Analiza gradientului de transmisie în conjugările HfrxF⁻*. În afară de harta genetică orientativă determinată prin întreruperile transferului în care detectarea recombinanților constituie un test de „da sau nu" fără a interesa frecvența recombinanților, s-au efectuat numeroase experiențe de conjugare Hfr × F⁻ în care scopul l-a constituit determinarea frecvenței recombinanților pentru diferiți markeri. Prin aceasta s-a stabilit un principiu morganian pentru astfel de conjugări: cu cît locii markerilor genetici testați sînt mai apropiați de regiunea genetică directoare (prima transferată), cu atît frecvența recombinanților este mai mare și invers, cu cît locii testați sînt mai îndepărtați de regiunea directoare, cu atît probabilitatea apariției recombinanților este mai mică. Astfel se stabilește un gradient de transmisie prin determinarea frecvenței de recombinare, independent de harta genetică temporală. Gradientul verifică și analizează mai amănunțit harta genetică. 7) *Analiza moleculară a genelor bacteriene purtate de plasmide recombinant*. Plasmidele recombinant obținute prin tehnica manipulării genice permit practic analiza fizică a întregului genom bacterian prin constituirea de „bănci genice" (cap. XIV) în care fiecare genă este separat purtată de un plasmid cunoscut și analizată fizico-chimic.

c) *Utilizarea în ansamblu a metodelor de cartografiere pentru alcătuirea unei hărți genetice corespunzătoare întregului cromozom*. Atît hărțile orientative, cît și analiza segmentară din aproape în aproape prin metodele analitice expuse mai sus permit aprecierea cît mai exactă a structurii unei hărți genetice. Este de reamintit că fiecare metodă a fost subiectul a zeci sau sute de lucrări. Fiecare determinare de lincaj a unui locus a constituit un succes iar harta genetică a unei bacterii este redată în lucrări de sinteză care adună, compară și înscriu într-o hartă unitară datele acumulate de-a lungul a zeci de ani, cum este cazul hărții genetice a cromozomului de *E. coli* redată în fig. 102. Procedeele de analiză segmentară prin transducție și testul de trei factori au permis analize fine de cartografiere a unei gene prin mutanți purtători de schimbări punctiforme. Acestea, combinate cu secvențierea de aminoacizi, au permis stabilirea de hărți ale genelor, cum sînt harta genei pentru triptofan-sintetaza A de *E. coli* (Yanofski, 1971) sau harta genei *i* codificatoare a represorului lac (Müller-Hill, 1975).

Analizele de cartografie au stabilit că toate bacteriile au un singur grup de lincaj haploid în toate cazurile cercetate (*E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*), grupele de lincaj sînt închise și nu au markeri extremi ca la cromozomii de eucariote, iar hărțile genetice sînt circulare, cu excepția probabilă a grupului *Pseudomonas*, unde pînă în prezent lincajul este liniar.

*

* *

Scanned with OKEN Scanner

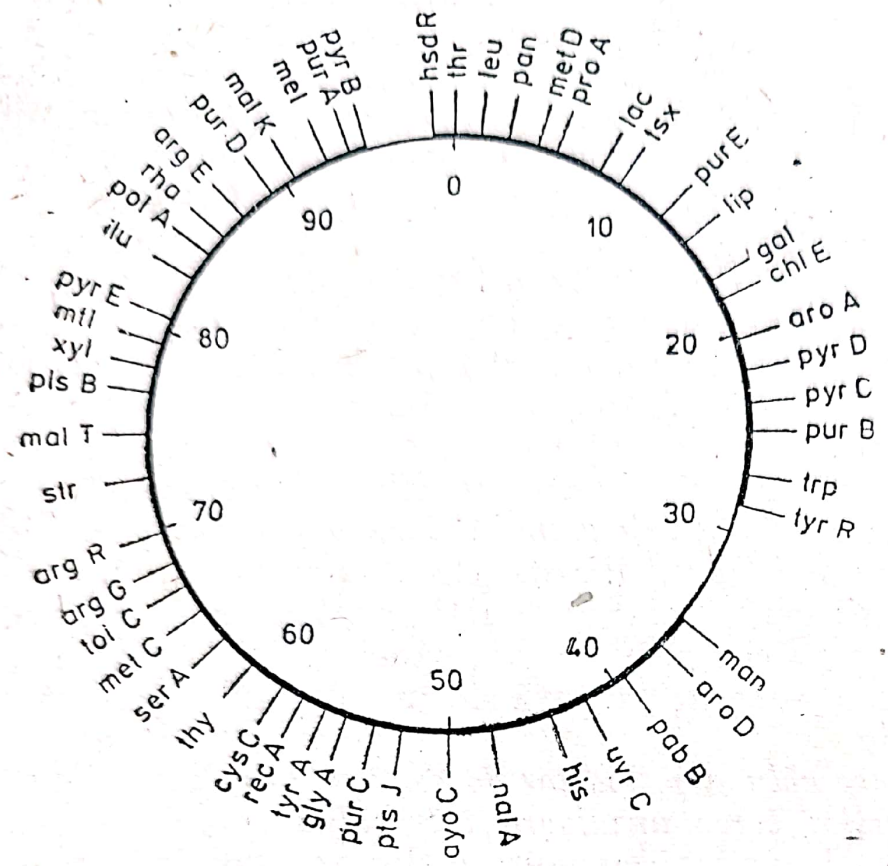


Fig. 102. Harta genetică circulară de referință a genomului de *E. coli* **K—12** (după Bachmann și colab., 1976). Sînt aceiași 52 de loci a căror poziție a fost determinată cu acurateţe prin metodele întreruperii de transfer în conjugare, cît și cu metodele analizelor segmentare. Sectoarele îngroșate au fost analizate și prin cotransducție cu fagul P1. Întreaga hartă este general orientată prin minute de transfer (cifrele din interior). Fiecare marker este denumit în funcție de defectul mutațional. Ei reprezintă „pilonii de reper" pentru cartarea altor diferențe marker. În această hartă regiuni genetice întregi sînt reprezentate numai cu un punct, ca și cum nu ar avea dimensiuni. De exemplu, locusul lac din dreptul minutului 8 este o regiune genetică întreagă ocupată de operonul lac.

Din descrierea foarte succintă a cartografierii genetice în care principiile clasice sînt ancorate la metodele moleculare mai recente rezultă clar perenitatea principiilor bazale în metodologia genetică. De exemplu, procesul predominant molecular al transformării genetice este asemănător unei translocații cromozomice la eucariote, deoarece ca și în transformare există un cromozom donor de segmente și un cromozom acceptor. Singura diferență majoră constă în condițiile desfășurării procesului: pe cînd în transformare intervin condiții experimentale de extracție a ADN și captare în celula acceptoare, în translocație cei doi cromozomi se găsesc natural în condiții de schimb genetic.

Făcînd o paralelă între metodologia cartografierii la om și cea de la bacterii, se observă un număr mare de analogii pentru stabilirea lincajului: secvențiere de aminoacizi și cartografieri genetice fine, eliminări de cromozomi din hibrizii somatici și educții, deleții spontane la bacterii și anomalii structurale la om, analize genetice parasexuale în ambele cazuri impuse cu necesitate (imposibilitatea împerecherilor experimentale la om, lipsa de schimb genetic la numeroase bacterii). Genetica moleculară, care a început cu sisteme experimentale bacteriene, este în întregime o confirmare la nivel bazal a principiilor geneticii clasice și ilustrează unitatea de concepții mai ales prin manipularea de gene și construcția de himere (cap. XIV).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul XIII

PLASMIDE BACTERIENE

ȘERBAN IORDĂNESCU

Plasmidele sînt repliconi moșteniți stabil în stare extracromozomală (Novick și colab., 1976). Denumirea de plasmid a fost introdusă în 1952 de Lederberg, ca un termen generic pentru elemente extracromozomale, dar nu a căpătat o largă utilizare decît în ultimul deceniu. Alături de plasmidele bacteriene, în noțiunea de elemente extracromozomale se cuprinde și genomul mitocondriilor și al altor organite din celulele eucariote (cap. VI). Plasmidele bacteriene constituie un grup taxonomic bine diferențiat. Inițial observate și studiate în enterobacterii, plasmidele s-au dovedit a fi prezente în toate speciile bacteriene în care au fost căutate. O mare varietate de proprietăți ale celulelor bacteriene pot fi specificate de plasmide, cuprinzînd — pe lîngă binecunoscuta rezistență la antibiotice — producerea de bacteriocine, toxine sau factori de virulență, promovarea transferului cromozomului bacterian prin conjugare, sinteza enzimelor unor căi metabolice degradative etc. Prin proprietățile pe care le codifică, plasmidele permit supraviețuirea gazdei în condiții deosebite de mediu, dar sînt dispensabile în condiții normale. Deși plasmidele bacteriene constituie o entitate distinctă de bacteriofagi, există situații în care o tranziție între cele două clase este posibilă. Astfel, anumiți fagi, ca P_1 în *Echerichia coli*, sînt menținuți în celulele lizogene ca elemente extracromozomale stabile, iar alți fagi, cu genomul format din ADN monocatenar, precum f_1, fd și M 13, pot stabili o relație de echilibru cu gazda în care sînt menținuți în stare extracromozomală, deși determină o producere continuă de particule fagice infective.

Plasmidele bacteriene sînt constituite din molecule de ADN bicatenar circulare cu o dimensiune caracteristică fiecăruia. Dimensiunile plasmidelor cunoscute pînă în prezent, exprimate în greutăți moleculare, sînt distribuite între $1{,}5 \times 10^6$ și peste 200×10^6 daltoni. Genomul plasmidelor poate fi teoretic împărțit în două porțiuni: una esențială autonomiei replicative a plasmidului și alta care determină funcțiile somatice exprimate în fenotipul gazdei.

1. Menținerea plasmidelor în celula gazdă. Problema esențială a biologiei plasmidelor constă în înțelegerea mecanismelor care asigură

Scanned with OKEN Scanner

menținerea lor stabilă în celula gazdă. Acestea cuprind pe de o parte un control al replicării plasmidelor, care să ducă la duplicarea materialului lor genetic în decursul fiecărei generații celulare, iar pe de altă parte, un proces de partiție care să asigure primirea la diviziune de către fiecare celulă fiică a cel puțin unei molecule (copii) plasmidice. Replicarea plasmidelor poate fi considerată din două puncte de vedere : pe de o parte replicarea moleculelor individuale de ADN plasmidic, iar pe de alta modul în care are loc dublarea numărului de copii plasmidice din celulă în decursul unui ciclu de diviziune.

1. Replicarea ADN plasmidic. Replicarea plasmidelor nu ridică probleme deosebite față de replicarea oricărui alt ADN bicatenar circular, închis covalent.

Originea, direcția și terminarea replicării. Pentru o serie de plasmide s-a căutat să se precizeze dacă replicarea este totdeauna inițiată la același situs de pe genom și dacă da, care este localizarea acestei origini replicative și în ce direcție progresează ulterior replicarea. În cazul unor plasmide cu dimensiuni reduse, abordarea acestor probleme s-a putut realiza prin tehnica pusă la punct de Farreed și colab. (1972) pentru virusul SV 40. Tehnica se bazează pe izolarea moleculelor ADN în replicare, tratarea lor cu o endonucleză de restricție adecvată și examinarea lor la microscopul electronic. Tehnica permite obținerea unor date neambigue în special în cazul repliconilor care poartă un singur situs sensibil la acțiunea endonucleazei de restricție utilizate, situs care poate fi folosit ca un punct de referință pentru alinierea moleculelor studiate, singura problemă fiind polaritatea acestor molecule liniare (fig. 103).

În cazul plasmidului ColE1 de $4{,}2 \times 10^6$ daltoni, care determină producerea și imunitatea la colicina E1 și constituie unul dintre cele mai mult studiate plasmide mici, datele obținute în mai multe laboratoare (Lovett și colab., 1974; Inselburg, 1974; Tomizawa, 1975) atestă existența unei singure origini replicative plasate la 16—18% din lungimea moleculei de unicul sit pentru endonucleaza de restricție *Eco*RI și progresarea unidirecțională a replicării. Date care atestă o replicare unidirecțională de la o origine unică s-au obținut pentru cel puțin un alt plasmid mic, pSC101 (Cabello și colab., 1976). În schimb, un plasmid de rezistență la antibiotice — R6K și derivatul său deletat RSF1040 prezintă un mod mult mai complex de replicare. Replicarea poate fi inițiată de la două origini distincte, notate α și β. Deși o singură origine este activă în replicarea majorității moleculelor, 5% dintre acestea au o structură care sugerează posibilitatea inițierii replicării simultan la ambele origini. Replicarea de la fiecare origine are un caracter bidirecțional secvențial, în sensul că replicarea progresează inițial într-o anumită direcție pînă la atingerea unei regiuni terminus, cu o localizare fixă pe genom, apoi în direcție opusă pînă la același terminus (Crosa și colab., 1978). Obținerea

Scanned with OKEN Scanner

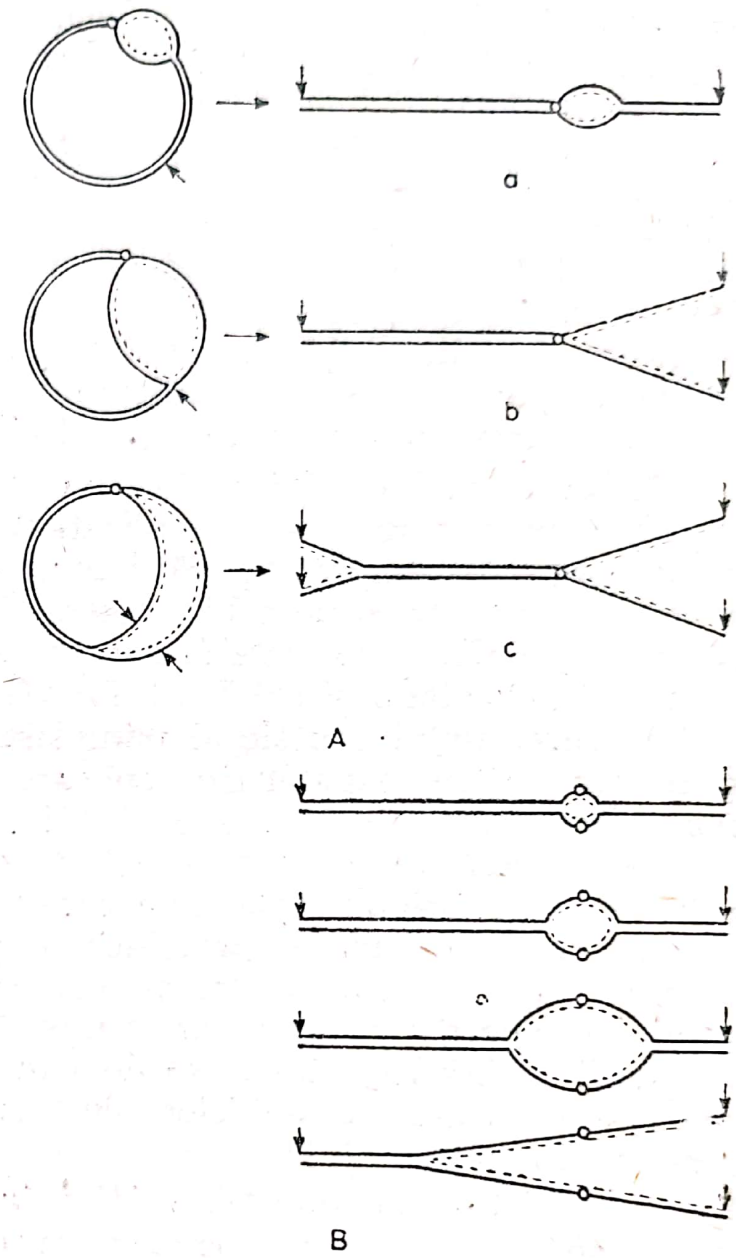


Fig. 103. **Principiul tehnicii pentru localizarea originii replicative şi precizarea direcţiei replicării.** o = originea replicării; ↓ = situl de acţiune al endonucleazei de restricţie utilizate. Trei tipuri de structuri pot apărea în urma tratării moleculelor circulare de ADN în replicare cu endonucleaza de restricţie, în funcţie de ajungerea undei de replicare la nivelul sitului de endonuclează restrictivă utilizată (A — a, b şi c). Menţinerea constantă a distanţei dintre unul din capetele moleculei liniare şi bifurcarea replicativă cu scăderea progresivă a celuilalt braţ nereplicat al moleculei (A) permite susţinerea unei replicări unidirecţionale şi localizarea originii la nivelul bifurcării staţionare. În cazul unei replicări bidirecţionale (B) ambele braţe nereplicate ale moleculei se reduc pe măsură ce replicarea progresează, localizarea originii fiind precizată pe baza poziţiei buclelor de replicare în molecule cu un grad foarte redus de replicare.

de date asupra originii şi direcţiei replicării este mult mai dificilă în cazul plasmidelor cu dimensiuni mari. Un exemplu este plasmidul de rezistenţă (R) — NR1. Ca şi alte plasmide R conjugative mari, NR1 este considerat a fi format din două componente: RTF, responsabil de capacitatea de transfer prin conjugare a plasmidului, şi r, care poartă determinanţii de rezistenţă la antibiotice. În încercarea de a se stabili dacă ambele componente ale NR1 sînt capabile de replicare autonomă, una din abordări a constat în precizarea localizării originii replicării plasmidului NR1. Datele obţinute au fost însă contradictorii, reflectînd dificultăţile unui astfel de studiu. După Perlman (1978), NR1 ar avea două origini replicative, una în RTF şi alta în r, cu utilizarea preferenţială a originii din r şi replicare uni- sau bidirecţională de la aceste origini; în schimb, Silver şi colab. (1977) au găsit o singură origine replicativă în RTF şi consideră repli-

Scanned with OKEN Scanner

carea unidirecțională. Un alt mod de abordare în precizarea originii replicării unor plasmide cu dimensiuni mari constă în studierea unor derivați ai lor cu dimensiuni mult mai reduse, obținuți spontan *in vivo* sau prin clonare *in vitro* și care păstrează aparent toate caracterele replicative ale plasmidelor parentale (vezi subcap. 3e). Rezultatele obținute cu acești derivați sînt ușor de interpretat, dar nu se poate preciza cît de fidel reflectă modul de replicare al plasmidelor originale. Prin studierea a trei miniplasmide derivate din NR1, Ohtsubo și colab. (1977) au dovedit o replicare unidirecțională de la o origine unică, comună tuturor, care are o localizare pe harta NR1 corespunzătoare originii definite de Silver și colab. (1977).

Prezența unei origini replicative specifice pare a fi o condiție esențială pentru autonomia replicativă a oricărui replicon. De aceea, datele obținute asupra replicării unui miniplasmid derivat din plasmidul F prezintă un deosebit interes. Miniplasmidul pML31 prezintă o origine replicativă plasată la 42,6k b pe harta F, cu replicare bidirecțională (Eichenlaub și colab., 1977). În cazul deleției acestei origini, restul materialului genetic al miniplasmidului continuă, în mod surprinzător, să fie capabil de replicare autonomă cu utilizarea unei noi origini localizate la 44,4 kbF (Figurski și colab., 1978). Pe baza datelor prezentate se poate conchide că fiecare plasmid poartă una sau mai multe origini replicative, care ar constitui o secvență specifică de recunoaștere pentru proteinele implicate în inițierea replicării. Ulterior, replicarea poate progresa fie uni-, fie bidirecțional. Existența unui situs specific de terminare a replicării, similar celui de pe cromozomul *E. coli*, a fost raportată doar în cazul plasmidului R6K. Mecanismele replicării plasmidelor sînt asemănătoare cu cele generale descrise în capitolul III.

2. *Replicarea copiilor plasmidice în cursul ciclului celular*. Precizarea modului în care are loc alegerea copiilor plasmidice pentru replicare și a timpului din ciclul celular la care are loc replicarea lor constituie o problemă importantă în înțelegerea mecanismelor care intervin în controlul replicării plasmidelor. Teoretic sînt două posibilități: 1) replicare ordonată în care fiecare copie plasmidică realizează o rundă de replicare pe ciclu de diviziune, replicarea putînd fi sincronă — în sensul că toate copiile unui plasmid se replică simultan la un anumit moment al ciclului celular — sau nu; 2) replicare întîmplătoare, cu alegerea aleatorie a copiilor plasmidice pentru replicare, astfel încît unele copii pot realiza mai mult de un ciclu de replicare în cursul unei generații, iar altele nu sînt replicate deloc în perioada respectivă. Acest mod de replicare duce în mod necesar la un caracter asincron al replicării, proces care se distribuie pe o mare parte din ciclul de diviziune. În cazul plasmidelor prezente în copii multiple în celulă, alegerea întîmplătoare a copiilor pentru replicare pare să fie regula (Rownd, 1969). În schimb, există divergențe asupra com-

Scanned with OKEN Scanner

portării plasmidelor prezente într-un număr redus (1—2) de copii pe genom bacterian. În acest caz, s-a susținut replicarea ordonată, sincronă a tuturor copiilor unui plasmid la un anumit moment al ciclului de diviziune. Replicarea acestor plasmide nu ar fi însă cuplată cu nici o etapă a replicării cromozomului sau a ciclului de diviziune; masa celulară la care s-ar produce inițierea replicării plasmidelor ar crește la accelerarea creșterii celulare (Pritchard și colab., 1975). Pe de altă parte, date recente obținute prin abordări diferite sugerează și în cazul plasmidelor cu număr redus de copii F și R1 o alegere întîmplătoare a copiilor pentru replicare, cu distribuirea replicării plasmidice pe întreaga durată a ciclului de diviziune și caracter secvențial al rundelor de replicare (Nordström și colab., 1978).

3. Funcții necesare menținerii stabile a plasmidelor în celulă. A. Biosinteza proteinelor. Este bine cunoscut că blocarea sintezei proteinice împiedică inițierea unor noi runde de replicare a cromozomului bacterian. Din acest punct de vedere, plasmidele pot fi împărțite în două categorii: a) plasmide mici (ColEl, CloDF13 și RSF1030) care continuă să se replice în absența sintezei proteinice, uneori chiar cu o rată crescută, ducînd la acumularea unui mare număr de copii plasmidice pe celulă (Clewell, 1972); b) plasmide cu dimensiuni mai mari, a căror replicare depinde de o sinteză proteinică activă. Necesitatea sintezei proteinice constituie o caracteristică intrinsecă a sistemului replicativ al unui plasmid și nu ține de dimensiunea sa, fapt dovedit de comportarea identică din acest punct de vedere a unor plasmide „mari" și a derivaților lor cu dimensiuni mult reduse (Mayer și colab., 1977). S-a sugerat că în general plasmidele care utilizează pentru replicare polimeraza I nu necesită sinteza proteinică pentru inițierea replicării (Grindley și Kelley, 1976). *B. Funcții asigurate de celula gazdă.* Prin cantitatea lor relativ redusă de material genetic, plasmidele nu-și pot asigura toate funcțiile necesare replicării autonome. Ca urmare, menținerea stabilă a plasmidelor depinde de o serie de funcții determinate atît de gene cromozomale cunoscute a fi implicate în metabolismul ADN, cît și de unii determinanți cromozomali care aparent au un rol specific în menținerea anumitor plasmide.

a) *Determinanți cromozomali implicați în metabolismul ADN.* Datele acumulate asupra implicării polimerazelor bacteriene în replicarea plasmidelor sugerează că Pol I este esențială pentru replicarea multor plasmide mici, în timp ce Pol III intervine în replicarea majorității plasmidelor cu dimensiuni mari. Unele date sugerează însă un rol al Pol III și în cazul replicării unor plasmide mici, precum ColEl. La *E. coli* s-au identificat numeroase alte gene, notate *dna*, a căror funcție este necesară pentru inițierea și realizarea replicării cromozomului. Datele asupra rolului acestor gene în replicarea diferitelor plasmide nu sînt totdeauna concordante. Totuși, cîteva concluzii se pot trage. Dintre genele cunoscute a interveni în inițierea repli-

Scanned with OKEN Scanner

cării cromozomului, *dnaC* pare a fi necesară și pentru replicarea tuturor plasmidelor studiate, în timp ce *dnaA* ar interveni în replicarea unor plasmide ca pSC101 și ColE1, dar nu a altora: F, R1, P1 sau ClodF13. Gena *dnaB* cu rol în alungirea catenelor în procesul replicării cromozomului pare a avea un rol în replicarea unor plasmide mari, dar nu și a plasmidelor mici ColE1 și ClodF13.

b) *Determinanți cromozomali cu rol specific în menținerea unor plasmide.* O categorie de mutanți mult utilizați în studiile asupra replicării plasmidelor o constituie mutanții termosensibili care mențin stabil plasmidele la temperatură redusă, dar nu și la o temperatură mai ridicată. În toate studiile în care s-au izolat astfel de mutanți, prin mutageneza celulelor purtătoare de plasmide, s-a demonstrat că o parte dintre ei poartă mutații pe plasmide, în timp ce restul prezintă mutații cromozomale (Jacob și colab., 1963; Kingsbury și Helinski, 1973). În majoritatea cazurilor nu s-a putut depista un alt efect al acestor mutații cromozomale. Multe dintre mutații par a afecta specific doar stabilitatea unui grup strîns înrudit de plasmide (Kingsbury și Helinski, 1973; Novick și colab., 1975*). Nu se cunoaște încă modul în care intervin genele respective în menținerea plasmidelor.

c) *Specificitatea gazdei în menținerea plasmidelor.* Implicarea unui mare număr de gene cromozomale în procesul menținerii plasmidelor în celulă duce la ideea unei relații specifice plasmid – gazdă, în sensul capacității plasmidelor de a se instala și a se menține doar în gazda lor naturală sau în gazde strîns înrudite cu aceasta. O primă excepție de la această ipoteză este constituită de plasmidele R cu spectru larg de gazde RP1 și RK2 izolate din tulpini de *Pseudomonas*. Acestea pot fi însă considerate a reprezenta rezultatul unui proces evolutiv deosebit care le-a asigurat capacitatea de a se instala și menține în specii bacteriene diferite. Pe de altă parte, posibilitatea introducerii de plasmide stafilococice prin transformare în *B. subtilis* și menținerea lor stabilă în această gazdă (Ehrlich, 1977), ca și transferul prin transformare al unor plasmide de rezistență de la *H. influenzae* și *N. gonorrhoeae* la *E. coli* (Falkow și colab., 1977*) pun la îndoială validitatea afirmației de mai sus, cel puțin în cazul unor plasmide cu dimensiuni reduse, cum sînt cele din studiile raportate.

C. *Funcții asigurate de plasmide.* a) *Mutanți plasmidici termosensibili (ts).* S-au făcut numeroase studii în scopul precizării numărului de determinanți ai unui plasmid necesari pentru autonomia sa replicativă și a funcției acestora. Una din abordări a constat din izolarea și carac-

* Citatele din acest capitol care nu se găsesc în bibliografie derivă din trei simpozioane ținute în ultimii ani: 1) 1975 — D. Schlessinger (ed.), Microbiology, 1974, ASM Washington, D.C.; 2) 1977 — J. Drews & G. Högenauer (editori) R factors: Their properties and possible control, Springer Verlag, Wien—New York; 3) 1978 — D. Schlessinger (ed.), Microbiology, ASM, Washington, D.C. Aceste citate sînt notate cu asterisc.

Scanned with OKEN Scanner

terizarea de mutanți plasmidici *ts* în cazul a diferite plasmide naturale: F (Jacob și colab., 1963); ColE_1 (Kingsbury și Helinski, 1973); pI258 (Novick și colab., 1975*) etc. Mutanții *ts* caracterizați s-au dovedit a avea la temperatură restrictivă defecte în replicarea ADN și nu în procesul de segregare. Blocarea replicării lor pare a avea loc întotdeauna la nivelul inițierii și în majoritatea cazurilor nu este totală, cel puțin în limitele temperaturilor restrictive care pot fi utilizate fără a afecta creșterea celulelor gazdă (Novick și colab., 1975*). Chiar la temperatură permisivă unii mutanți plasmidici *ts* par a prezenta un defect în replicarea lor, deoarece sînt menținuți în celulă într-un număr mai redus de copii decît plasmidul parental (Rush și colab., 1975). Posibilitatea izolării de mutanți plasmidici *ts* este interpretată în general ca o dovadă a implicării cel puțin a unei proteine codificate plasmidic în procesul de replicare, probabil la nivelul inițierii. Totuși, în cazul plasmidului ColE_1 este mai greu de precizat funcția proteinei care ar fi afectată în mutanții *ts*, deoarece replicarea ADN al acestor mutanți încetează doar după un timp relativ lung de la trecerea la temperatură nepermisivă (Kingsbury și Helinski, 1973), iar studiile pe sisteme acelulare au dus la concluzia că în aceste condiții nici o proteină codificată plasmidic nu este necesară pentru replicarea ADN plasmidic (Tomizawa și colab., 1975). S-a sugerat că mutanții *ts* ai ColE_1 ar prezenta o alterare a unui mecanism de reglare a replicării, care ar acționa doar *in vivo* (Tomizawa și colab., 1975). Izolarea de mutanți *ts* nu permite *per se* precizarea numărului de gene plasmidice implicate în replicare sau a caracterului difuzibil sau nedifuzibil al produselor lor, pentru aceasta fiind necesare studii de complementare. Complementarea defectelor de replicare ale mutanților *ts* nu se poate în general realiza de către plasmide compatibile cu acestea, sugerînd o specificitate de grup de incompatibilitate (vezi subcap. 2) a proteinei codificate plasmidic. Realizarea de studii de complementare între plasmide incompatibile este, în schimb, foarte dificilă, tocmai datorită caracterului lor incompatibil. Datele obținute mai de mult de Jacob și colab. (1963) asupra posibilității complementării unui plasmid F *ts* de către un alt plasmid F normal nu mai pot fi considerate concludente în contextul cunoștințelor actuale (Novick și colab., 1975). Dealtfel, un studiu recent, care a utilizat același sistem plasmidic nu a putut evidenția o complementare pe scurta perioadă de coexistență a celor două plasmide F (Jamieson și Bergquist, 1977). Realizarea de studii de complementare a devenit posibilă însă prin izolarea de derivați incompatibilitate-defectivi din unele plasmide (vezi subcap. 2). În cazul a două plasmide diferite de la *S. aureus*, aceste studii au adus date în favoarea existenței unei singure gene plasmidice, notată *rep*, implicată în autonomia replicativă a plasmidului și al cărui produs este difuzibil (Novick și Schwesinger, 1976, Iordănescu, 1978).

Scanned with OKEN Scanner

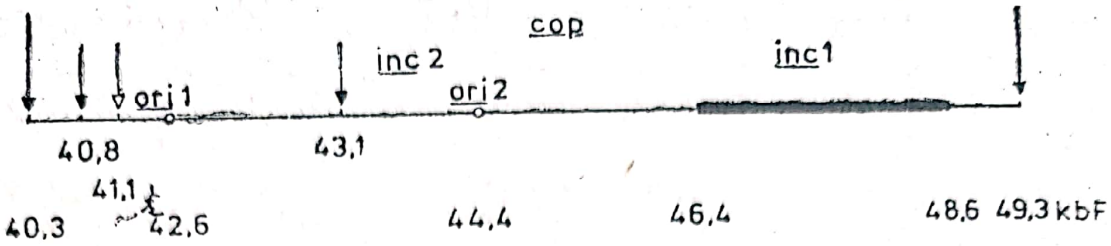


Fig. 104. **Regiunea plasmidului F esențială pentru autonomia replicativă.** Coordonatele sînt date în kilobaze pe harta fizică a plasmidului F. Siturile endonucleazelor restrictive: ↓ *Eco*RI, | Bam HI ↓ Hind III. ori 1 = originea replicativă normală a miniplasmidului F; ori 2 = origine replicativă secundară evidențiată în urma deleției ori 1; inc 1 = regiune de omologie între plasmidele de grup F1 considerată a reprezenta un locus inc (Palchaudhuri și Maas, 1978); inc 2 = locus inc adițional (Kline și colab., 1978); cop = locus implicat în controlul numărului de copii plasmidice, eventual corelat sau identic cu inc 2 (Kline și colab., 1978).

b) *Porțiunea minimă din genomul plasmidic necesară pentru autonomie replicativă.* Metodele moderne de clonare a fragmentelor ADN generate prin tratarea *in vitro* cu endonucleaze de restricție, cuplate cu analiza heteroduplex, au permis obținerea de informații asupra porțiunii minime din genomul unor plasmide care este necesară și suficientă pentru replicare autonomă. În acest scop, fragmentele generate cu endonucleaze de restricție din genomul plasmidic au fost unite *in vitro* cu fragmente ADN care poartă un marker ușor testabil și care nu sînt capabile de autoreplicare. Hibrizii obținuți au fost testați pentru capacitatea lor de instalare și menținere într-o gazdă adecvată, în care erau introduși prin transformare. Utilizînd acest procedeu, în cazul plasmidului F s-a găsit că un singur fragment generat cu *Eco*RI — fragmentul f5 cu coordonatele 40,3—49,3 kbF — este capabil de replicare autonomă în *E. coli* (Skurray și colab., 1976) (fig. 104). Miniplasmidele F astfel generate au caractere de replicare (Timmis și colab., 1978*) și incompatibilitate (Pfister și colab., 1976) similare cu F. Studii similare au fost efectuate și în cazul plasmidului R6 prin clonarea fragmentelor generate cu *Eco*RI sau *Hind* III. Un singur fragment *Eco*RI a fost găsit a se putea replica autonom — fragmentul B — care provine din RTF (Timmis și colab., 1978*).

Utilizarea unei metode diferite, care constă în unirea fragmentelor ADN din plasmidul de studiat cu un derivat ColE1 și testarea stabilității hibrizilor în tulpini *polA* (*ts*) la temperatură nepermisivă pentru componentul ColE1, a permis evidențierea altor două fragmente *Eco*RI din plasmidul R6, care în aceste condiții asigură o replicare autonomă a hibrizilor. Nu se cunoaște natura funcțiilor asigurate de aceste fragmente și nici modul de replicare a hibrizilor în tulpini *polA* la temperatură nepermisivă (Timmis și colab., 1978*).

Datele obținute și cu alte două plasmide, ColE1 și R6K, au dus la aceeași concluzie generală, și anume că există o legătură strînsă

între genele esențiale în replicarea și în controlul său și cele care determină proprietățile de incompatibilitate, în apropierea originii replicative, astfel încît o regiune foarte redusă dintr-un plasmid — de 1—3kb, este suficientă pentru a asigura un mod de replicare autonomă similar cu cel al parentalului. Deoarece cantitatea de informație cuprinsă în această regiune nu poate codifica decît 2—5 lanțuri polipeptidice cu greutate medie de 20 000 daltoni, rezultă că un plasmid contribuie la propria sa replicare cu un număr redus de produse difuzibile, un rol mai important putînd avea anumite secvențe specifice de recunoaștere prezente în regiunea respectivă, printre care originea replicării.

4. *Controlul replicării plasmidelor.* a) *Multiplicitatea plasmidelor.* În celula gazdă sînt prezente mai multe copii ale unui plasmid. Numărul de copii raportat pe celulă sau pe echivalent de cromozom bacterian constituie o caracteristică pentru un anumit plasmid într-o anumită gazdă (Cabello și colab., 1976). Derivații plasmidici obținuți *in vitro* păstrează în general această caracteristică. Valorile raportate în literatură pentru multiplicitatea a diferite plasmide variază între 1 și cîteva sute copii/cromozom. Numărul de copii plasmidice/cromozom poate prezenta unele variații fiziologice. Cel puțin în cazul unor plasmide, ca F, R1 și P1, s-a raportat o reducere în numărul de copii/cromozom la accelerarea creșterii celulelor. Pe de altă parte, unele plasmide, ca NR1 în *P. mirabilis* (Rownd, 1969) și R6K în *E. coli*, sînt capabile să-și continue replicarea la intrarea culturii în fază staționară și după ce replicarea cromozomului a încetat, ducînd în aceste condiții la o creștere semnificativă în numărul de copii/cromozom. Plasmidele de acest tip, capabile de replicare și în absența replicării cromozomului, au fost considerate a avea un control relaxat al replicării spre deosebire de controlul stringent la care sînt supuse plasmidele a căror replicare are loc doar în prezența replicării cromozomului (Novick și colab., 1976) (fig. 105). Prezența unui număr caracteristic de copii plasmidice pe cromozom implică existența unui mecanism de control al replicării care să asigure exact dublarea numărului copiilor plasmidice în decursul fiecărui ciclu de diviziune. S-a sugerat însă și posibilitatea ca numărul de copii în care este prezent un anumit plasmid să nu fie decît o reflectare a capacității celulei de a menține o anumită cantitate limitată de ADN extracromozomal, majorita-

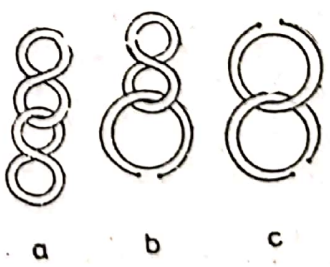


Fig. 105. Forme catenate ale ADN plasmidic. Două molecule circulare sînt unite ca verigile într-un lanț. După configurația circular covalent închisă(cc) sau circular deschisă (oc)a celor două molecule de ADN, se pot întîlni forme catenate: cc—cc(a), cc—oc(b) și oc—oc(c).

Scanned with OKEN Scanner

tea plasmidelor avînd tendința de a umple tot acest spațiu (Ruby și Novick, 1975). Această ipoteză este însă contrazisă, cel puțin în cazul unor plasmide la care s-a demonstrat că derivații lor cu dimensiuni mult mai reduse sînt menținuți în același număr de copii/cromozom. Există și situații în care unii derivați plasmidici cu dimensiuni reduse par a scăpa de sub un control specific și ating un mare număr de copii/celulă. În această categorie se încadrează unele miniplasmide derivate spontan *in vivo*, ca RscII (Mayer și colab., 1977) și pVH51(Hershfield și colab., 1976). În cazul acestor derivați s-a observat o comportare de tipul celei prezise de modelul lui Ruby și Novick (1975) : adiția de material genetic duce la o reducere în numărul de copii plasmidice/celulă, cu menținerea cantității totale de ADN extracromozomal/cromozom aproximativ la același nivel. Rezultă că un anumit mecanism de control, eventual impus de gazdă, s-ar exercita și în cazul acestor plasmide. S-au raportat însă și situații în care replicarea ADN plasmidic pare a scăpa de sub orice control și atinge valori atît de mari, încît devine letală pentru gazdă (Grindley și colab., 1978*) ; Nordström și colab., 1978*).

b) *Controlul multiplicității plasmidice. Determinare plasmidică.* Ca și în cazul factorilor necesari replicării plasmidelor, și în mecanismul de control al replicării par a interveni atît determinanți plasmidici, cît și cromozomali. Implicarea unor determinanți plasmidici în mecanismul care asigură păstrarea numărului de copii la o anumită valoare constantă se bazează în primul rînd pe izolarea unei clase de mutanți plasmidici, notați *cop*, care sînt menținuți în celulă într-un număr crescut de copii față de parentalii lor. Un mare număr de mutanți *cop* au fost izolați din plasmidul R1. Mutațiile *cop* obținute într-o singură etapă prezintă un efect de creștere în numărul de copii față de plasmidul parental, care pentru diferiți mutanți testați se distribuie relativ uniform între 2 și 10. Recent, s-a reușit și izolarea de mutanți *cop* termodependenți sau care poartă mutații amber (cap. XII), ceea ce demonstrează neechivoc implicarea unei proteine codificate de plasmid, cu funcție de represor, în controlul replicării plasmidului. S-au obținut unele date indirecte care atestă că sinteza acestui represor ar fi, la rîndul ei, supusă unui control (Nordström și colab., 1977*). Date preliminare localizează gena *cop* a plasmidului R1 în apropierea originii replicative. Mutanți *cop* au fost obținuți și din plasmidele NR1, NTP1 și CloDF13. Pe lîngă mutațiile *cop* care ar afecta specific mecanismul de control al replicării plasmidului și alte mutații plasmidice pot duce la modificarea numărului de copii per celulă. S-a menționat că unii mutanți plasmidici *ts* pot fi menținuți chiar la temperatură permisivă într-un număr redus de copii (Rush și colab., 1975). De asemenea, mutațiile care determină exprimarea constitutivă a unor gene plasmidice pot duce la reducerea numărului de copii ale acelui plasmid (Rush și colab., 1975). *Rolul gazdei.*

Scanned with OKEN Scanner

S-au izolat mutanți ai unei tulpini *E.coli* care asigură menținerea plasmidului R6K într-un număr dublu de copii față de tulpina originală. Efectul mutației respective pare a fi specific pentru R6K (Macrina și colab., 1974). Mutanți similari, care determină o creștere de pînă la 5 ori în numărul de copii ale plasmidului F, au fost raportați de Cress și Kline (1976). Unii dintre acești mutanți afectează concomitent multiplicitatea plasmidului P1.

c) *Replicarea structurilor cointegrate*. Studierea modului de replicare al cointegratelor — elemente compuse din doi sau mai mulți repliconi distincți, cunoscuți a fi capabili de replicare autonomă în stare independentă (Novick și colab., 1976) — a adus date interesante pentru înțelegerea mecanismului de reglare a replicării. Problema esențială ridicată de replicarea cointegratelor constă în precizarea componentului care asigură replicarea întregii structuri în diferite condiții și înțelegerea factorilor care determină activarea sistemului replicativ al unui replicon concomitent cu blocarea sistemului replicativ al celuilalt. Alături de cointegratul clasic cromozom bacterian — plasmid F, care a făcut în trecut obiectul a numeroase studii, deseori cu rezultate contradictorii (Pritchard și colab., 1975), în ultimii ani s-au utilizat în special cointegrate construite *in vitro*. Acești hibrizi cuprind în general un derivat al plasmidului ColEl, care nu se poate replica la temperatură restrictivă în gazde *polA (ts)*, dar continuă să se replice în prezența cloramfenicolului (cunoscut inhibitor al sintezei proteice) și un al doilea plasmid, care se poate replica — indiferent de temperatură — în *polA (ts)*, dar nu în prezența cloramfenicolului. În acest fel se asigură posibilitatea urmăririi separate a funcției celor două sisteme replicative ale cointegratului. În majoritatea cazurilor studiate, în condiții nepermisive pentru replicarea unuia din plasmide, hibrizii pot utiliza sistemul replicativ al celuilalt plasmid. În condiții permisive pentru ambele plasmide, replicarea se realizează — în acord cu modelul propus de Pritchard și colab. (1975) (vezi subcap. 1) — sub controlul plasmidului cu număr mai mare de copii (Cabello și colab., 1976). În toate condițiile hibrizii sînt prezenți într-un număr de copii caracteristic plasmidului care controlează replicarea. Există însă și excepții de la acest tip de comportare, cu incapacitatea funcționării unuia din sistemele replicative, chiar în condiții nepermisive pentru celălalt plasmid. Astfel, hibrizii între ColEl și RK2 nu se pot replica în prezența cloramfenicolului și sînt menținuți în celulă într-un număr redus de copii, caracteristic plasmidului RK2. În plus, s-a dovedit că și inserarea unor fragmente nereplicante din RK2, în ambele orientări posibile, la situsul *Eco*RI al ColEl împiedică replicarea acestuia în prezența cloramfenicolului (Figurski și colab., 1978*). O situație analoagă a fost raportată pentru hibrizii între ColEl și pUB501, cu unire *in vitro* tot la nivelul situsului *Eco*RI (Bennett și colab., 1977*). Deoarece

Scanned with OKEN Scanner

un plasmid ColEl normal poate fi excizat din acești hibrizi și replicarea ColEl nu este afectată în alți hibrizi construiți prin unire la același situs *Eco*RI, este greu în prezent să se înțeleagă modul în care se produce blocarea nereversibilă a sistemului replicativ ColEl în această clasă de hibrizi. *Factori implicați în controlul replicării.* Datele acumulate în ultimii ani asupra procesului replicării plasmidelor, prezentate succint în secțiunile precedente, permit să se definească cîteva elemente de care trebuie să se țină seama în construirea oricărui model de control al replicării plasmidelor. — *Inițiatorul.* Codificarea plasmidică (gena *rep*) a uneia sau unor proteine necesare pentru replicarea autonomă, probabil cu rol în inițiere, a fost dovedită de izolarea de mutanți plasmidici *ts*. Studiile de complementare, realizate în cîteva cazuri, au dovedit caracterul difuzibil și specificitatea de grup de incompatibilitate a acestei proteine. Se poate sugera că inițiatorul recunoaște specific secvența originii replicării, la nivelul căreia își exercită acțiunea sa în inițiere. Nu este precizat dacă sinteza inițiatorului este constitutivă sau supusă unui anumit tip de control, dar din considerente teoretice se susține necesitatea unui mecanism de reglare care să asigure sinteza sa cu o rată constantă, independentă de dozajul de genă (Nordström și colab., 1977*). S-a propus mai de mult un model după care ar avea loc sinteza unei cantități fixe de inițiator în timpul fiecărui ciclu celular (Rownd, 1969), dar pînă în prezent nu s-a reușit obținerea de date în favoarea acestei ipoteze. — *Represorul.* Existența unui produs specificat de plasmid, cu rol în controlul negativ al replicării plasmidului este susținută de izolarea mutanților *cop*. Acțiunea acestui represor s-ar exercita la un situs specific al plasmidului, dar nu în mod necesar la nivelul originii replicării. S-a sugerat că sinteza represorului este supusă unui mecanism specific de reglare, eventual de tipul autorepresiei (Nordström și colab., 1977*). — *Parametrul recunoscut de mecanismul de control.* Considerînd numărul normal de copii ale unui plasmid în celula nou născută N, se pot imagina teoretic trei moduri de reglare a numărului de copii: 1) dublarea numărului de copii prezente în celulă în timpul unei generații celulare — ceea ce este puțin probabil, deoarece nu s-ar explica atingerea valorii N în urma introducerii unei singure copii într-o celulă și nici posibilitatea corectării unor eventuale devieri apărute în numărul de copii; 2) recunoașterea de către mecanismul de control a numărului de copii existente în celulă și permiterea replicării pînă la atingerea nivelului 2N înaintea diviziunii celulei; 3) realizarea a N cicluri de replicare plasmidică per ciclu de diviziune, indiferent de numărul de copii existente la începutul ciclului (Novick și Hopensteadt, 1978). Utilizarea unor sisteme plasmid-gazdă în care valoarea N variază cu condițiile de creștere a permis studierea cineticii replicării în condiții de tranziție și a adus date în favoarea ultimei ipoteze: mecanismul de control ar dirija

Scanned with OKEN Scanner

frecvența replicării plasmidului în cursul unui ciclu celular, dar nu ar ține seama de numărul de copii plasmidice deja prezente în celulă. S-a sugerat un mod secvențial de replicare a copiilor plasmidice prezente în aceeași celulă, cu un interval între două runde succesive de replicare de 1/N din timpul de generație celulară (Nordström și colab., 1977*).

d) *Modele de control al replicării plasmidelor.* În decursul ultimilor 15 ani s-au propus mai multe modele de control al replicării plasmidelor ; totuși, pînă în prezent, nici un model nu permite explicarea satisfăcătoare a tuturor datelor experimentale acumulate. În mod clasic, modelele au fost împărțite în două tipuri : cu control pozitiv și cu control negativ. Cel mai cunoscut model cu control pozitiv este modelul repliconului, propus de Jacob și colab. (1963) (cap. III). Acesta s-a bucurat de o mare popularitate și a contribuit substanțial la progresul cunoștințelor în acest domeniu prin studiile la care a dat naștere. Totuși, acest model nu a mai putut explica o serie de date obținute ulterior, printre care : alegerea întîmplătoare a copiilor pentru replicare, incompatibilitatea între plasmide prezente în număr mare de copii sau între plasmide integrate și autonome, comportarea plasmidelor cointegrate etc. Ca un rezultat al dificultăților de explicare prin modelul repliconului a unei serii de date, s-a propus un model de control negativ (Pritchard și colab., 1969), care a dobîndit și el în scurt timp mulți susținători. După acest model, fiecare replicon ar sintetiza o cantitate de represor doar imediat după inițierea replicării, blocînd inițierea unor noi cicluri de replicare. Prin creșterea masei celulare, s-ar produce diluarea represorului. La scăderea concentrației represorului sub un anumit prag, s-ar produce inițierea replicării și sinteza unui nou puls de represor. Fiecare replicon ar necesita pentru inițiere o anumită creștere în masa celulară, așa-numita masă de inițiere, care ar fi invers proporțională cu numărul de copii plasmidice din celulă. Rezultatele obținute cu mutanții *cop* și cele asupra replicării plasmidelor cointegrate au fost interpretate prin acest model. Modelul nu atribuie nici un rol inițiatorului în procesul de reglare și nu explică în termeni moleculari preciși modul de corelare al sintezei represorului cu trecerea undei de replicare ADN la nivelul genei respective. În plus, un model de control de acest fel ar fi de așteptat să fie relativ imprecis, mai ales în cazul plasmidelor cu număr mare de copii, deoarece ar depinde de variații extrem de reduse în concentrația de represor, produse prin creșterea masei celulare. De asemenea, se știe că un anumit timp minim este necesar pentru sinteza unei proteine la derepresia unui operon, ceea ce în termenii modelului ar duce la inițieri multiple înainte de atingerea nivelului suficient de represor (Nordström și colab., 1977*). Toate aceste considerente au dus la ideea unor sisteme de control mixt, care ar opera atît cu elemente pozitive, cît și negative, ceea ce ar asigura un control mai eficient și flexibil al replicării. Un model de acest tip este modelul autorepresorului

Scanned with OKEN Scanner

(Sompayrac şi Maaløe, 1973), în care menţinerea constantă a concentraţiei unui iniţiator, indiferent de rata de creştere şi dozajul de genă, este asigurată prin specificarea de către acelaşi operon şi a unui autorepresor, care controlează rata transcrierii operonului. Acumularea unui anumit număr de molecule iniţiator per origine ar declanşa replicarea cu consumarea iniţiatorului. În fapt, se poate imagina o mare varietate de modele, dificultatea constînd în obţinerea de date certe în susţinerea lor. Ar fi util ca într-o primă etapă să se obţină informaţii asupra modului de reglare a exprimării genelor care codifică iniţiatorul şi represorul, cît şi asupra unor eventuale relaţii între acestea, în cazul unui acelaşi sistem plasmidic.

5. *Procesul de segregare (partiţie)*. Există puţine date asupra procesului de segregare a copiilor plasmidice la diviziunea celulei gazdă. În cazul plasmidelor cu număr redus de copii/cromozom, partiţia uniformă este strict necesară pentru menţinerea lor stabilă. Se cunoaşte raportarea în cazul plasmidului F a segregării ordonate a unei copii plasmidice împreună cu cromozomul pentru cel puţin opt generaţii celulare. Cele două elemente au fost considerate a forma o unitate de segregare, probabil prin ataşarea lor la aceeaşi structură, presupusă a fi membrana celulară (Cuzin şi Jacob, 1967). Mecanismul partiţiei plasmidelor cu număr mare de copii este mai dificil de precizat. Stabilitatea acestor plasmide ar putea fi asigurată şi în condiţiile unei distribuţii aleatorii la diviziune a copiilor plasmidice. Cu toate acestea, unele date pledează pentru o partiţie uniformă şi în cazul unor astfel de plasmide. Plasmidul pT169 de la *S.aureus*, cu toate că prezintă la 42,5 °C o rată de replicare de numai 5% din cea de la 30 °C, nu suferă o pierdere semnificativă la această temperatură, ceea ce sugerează o partiţie uniformă a copiilor cel puţin în aceste condiţii. Faptul că această comportare s-a observat în anumite tulpini, dar nu în altele sugerează şi un rol al gazdei în segregarea ordonată a plasmidelor (Della Latta şi colab., 1978). Majoritatea încercărilor de izolare de mutanţi plasmidici defectivi în segregare au eşuat. Singurul caz raportat pînă în prezent este reprezentat de un mutant al profagului-plasmid P7, care se pierde cu o rată ridicată la 42 °C, deşi rata replicării ADN al său la această temperatură este normală. S-a sugerat că mutaţia implicată a dus la trecerea de la echipartiţie la partiţie întîmplătoare (Scott şi colab., 1978*).

Din datele prezentate rezultă clar că numeroase aspecte ale procesului de segregare sînt încă neprecizate: structura celulară care ar asigura distribuirea copiilor plasmidice la celulele fiice şi specificitatea ei pentru diferite grupe de plasmide, mecanismul şi durata ataşării plasmidelor de structura ipotetică etc.

2. **Incompatibilitatea plasmidică.** 1. *Generalităţi*. Incompatibilitatea plasmidică reprezintă incapacitatea a două plasmide distincte

Scanned with OKEN Scanner

de a coexista stabil în aceeași celulă gazdă, în absența unei presiuni selective continue (Novick și colab., 1976). Deoarece derivații marcați genetic ai aceluiași plasmid s-au dovedit a fi întotdeauna mutual incompatibili, s-a ajuns la concluzia că incompatibilitatea este o proprietate intrinsecă a repliconilor. Relația de incompatibilitate între două plasmide prezintă două trăsături caracteristice : stringența incompatibilității, reflectată de rata de pierdere a plasmidelor din clone eteroplasmidice, și simetria incompatibilității, apreciată prin măsura în care plasmidele incompatibile au o probabilitate egală sau nu de a fi eliminate din clone eteroplasmidice. Există o serie de situații în care relațiile de incompatibilitate între două plasmide sînt unilaterale — doar un plasmid dintr-o pereche este eliminat din clone eteroplasmidice (Datta și Barth, 1976). Interpretarea acestor date este dificilă, în special cînd se utilizează plasmide a căror constituție genetică nu este precizată. Existența unor relații asimetrice de incompatibilitate trebuie avută în vedere de orice model asupra acestui fenomen. Incompatibilitatea se manifestă atît între două plasmide autonome, cît și atunci cînd unul dintre plasmide este integrat în alt replicon, indiferent dacă sistemul său replicativ este sau nu activ (Cabello și colab., 1976). Nu este încă precizat dacă cele două tipuri de relații implică același mecanism sau mecanisme diferite, dar este sigur că ele au o aceeași specificitate. Un alt tip posibil de relație interesează doi repliconi diferiți, care poartă integrat un același plasmid. În acord cu datele de mai sus, fiecare dintre acești repliconi manifestă incompatibilitate față de un plasmid autonom din același grup de incompatibilitate cu cel integrat. Totuși, cel puțin într-un caz s-a raportat că doi repliconi de acest fel sînt mutual compatibili (Iordănescu și Surdeanu, 1978).

2. *Încadrarea plasmidelor în grupe de incompatibilitate.* Deoarece plasmidele incompatibile s-au dovedit a fi strîns înrudite, criteriul incompatibilității a fost mult utilizat în clasificarea plasmidelor naturale. Plasmidele din același grup de incompatibilitate (grup Inc) sînt mutual incompatibile, dar compatibilie cu plasmide din toate celelalte grupe Inc. Încadrarea în grupe Inc a pus uneori probleme practice dificile generate fie de caracterul ambiguu al rezultatelor unor teste de incompatibilitate între plasmide naturale, fie de situația plasmidelor care poartă un unic marker testabil. În acest ultim caz, pentru testarea relațiilor de incompatibilitate între mai multe plasmide cu același marker s-a recurs la utilizarea de recombinanții între aceste plasmide și plasmide cu markeri diferiți. Pînă în prezent s-a reușit delimitarea a 25 grupe Inc pentru plasmidele de la bacterii enterice (Novick și colab., 1976) și 10 pentru plasmidele de la *S.aureus* (Iordănescu și colab., 1978). Strînsa înrudire dintre plasmidele din același grup Inc a fost demonstrată și prin studiile de stabilire a omologiei de secvență între plasmide. Plasmidele din același grup

Scanned with OKEN Scanner

Inc prezintă în general omologia a peste 70% din secvențele lor, în timp ce omologia dintre plasmide compatibile este redusă sau nulă (Grindley și colab., 1973, Iordănescu și colab., 1978). O excepție explicabilă este constituită de plasmidele compatibile care poartă determinanți somatici similari sau identici (Falkow și colab., 1974).

3. *Determinarea genetică a incompatibilității.* a) *Determinanți plasmidici. Izolarea de derivați incompatibilitate-defectivi.* Ca și în cazul altor caractere bacteriene, un mod de abordare al studiului incompatibilității plasmidice constă în încercarea de a izola și caracteriza mutanți defectivi. Pînă în prezent, izolarea de derivați incompatibilitate-defectivi (Inc$^-$) a fost însă raportată doar pentru puține plasmide. Toți derivații Inc$^-$ izolați sînt integrați în alți repliconi și, cu o excepție, sînt incapabili de a reveni în stare autonomă. Excepția este constituită de un plasmid F, care poartă o mutație Inc$^-$ ce se exprimă doar cînd plasmidul este integrat. La trecerea în stare autonomă plasmidul mutant se comportă similar cu plasmidul F normal (DeVries și colab., 1975*). Nu există nici o explicație pentru această comportare. Restul derivaților Inc$^-$ raportați par a fi suferit deleția unor regiuni din genomul lor, ceea ce duce la un defect replicativ *cis*-dominant. Totuși, cel puțin în cazul a doi derivați *Inc*$^-$ s-au dovedit prezența și funcția genei *rep*, esențială pentru autonomia replicativă a plasmidului (Novick și Schwesinger, 1976, Iordănescu, 1978). Deoarece majoritatea miniplasmidelor construite *in vitro* păstrează proprietățile de incompatibilitate ale plasmidelor originare, s-a conchis că locusul (locii) *inc* s-ar găsi în imediata vecinătate a regiunii esențiale pentru autonomia replicativă. În cazul plasmidului F s-a precizat localizarea locusului *inc* prin diferite procedee genetice și fizice. Prin analiza heteroduplex, Palchaudhuri și Maas (1978*) au demonstrat existența unei regiuni de omologie între diferite plasmide din grupul *Inc* FI cu coordonatele 46,4—48,6 kb pe harta F și absența omologiei în restul regiunii F implicate în autonomia respectivă. Deoarece regiunea de omologie evidentă nu era prezentă în cazul plasmidelor din alte grupe *Inc*, s-a sugerat că ar reprezenta locusul *inc*. Prezența unui locus *inc* în regiunea F cu coordonatele 45,8—49,3 a fost demonstrată și prin experiențe de clonare a fragmentului respectiv dintr-un mini F. Această abordare a permis în plus evidențierea unui al doilea locus implicat în incompatibilitate între 43,1—45,8 kbF (Kline și colab., 1978). O regiune de omologie a fost evidențiată și între diferite plasmide de grup FII în acea regiune a genomului lor cunoscută a fi implicată în autonomia replicativă (Palchaudhuri și Maas, 1978*). b) *Rolul gazdei.* Unele date sugerează posibilitatea influențării de către gazdă cel puțin a stringenței incompatibilității între două plasmide. S-a raportat astfel că mutațiile *dnaB* ar reduce incompatibilitatea între diferite perechi de plasmide F (Bezanson și Iyer, 1975), dar acest rezultat nu a putut fi confirmat de alți cercetători (Jamieson și Bergquist,

Scanned with OKEN Scanner

1977). S-a descris o mutație cromozomală care permite menținerea în aceeași celulă a două plasmide F aparent strict specifice pentru cele două plasmide utilizate (SanBlas și colab., 1974). Datele acestea sînt încă insuficiente pentru postularea unui rol al gazdei în relațiile de incompatibilitate.

4. *Mecanismul incompatibilității.* S-au acumulat numeroase date asupra mecanismului incompatibilității. O serie de rezultate pledează pentru o corelație între incompatibilitate și mecanismul de control al replicării plasmidelor. Astfel, mutanții *cop* ai plasmidului R1 prezintă în relațiile lor de incompatibilitate cu R100 două tipuri de comportare: fie eliminare preferențială a lui R100, fie doar pierderea lor din clonele eteroplasmidice, în timp ce plasmidul parental R1 prezintă o incompatibilitate simetrică față de R100. Rezultă că mecanismul de control al numărului de copii intervine în incompatibilitatea plasmidică (Uhlin și Nordström, 1975). Originea *per se* nu ar fi responsabilă de incompatibilitatea dintre plasmide, deoarece nu s-a observat nici o omologie de secvență între plasmide de grup FI la acest nivel (Palchaudhuri și Maas, 1978*), în timp ce plasmidele cu aceeași origine nu ar fi în mod obligatoriu incompatibile. Exprimarea incompatibilității față de un alt plasmid nu depinde de funcționarea sistemului replicativ al plasmidului respectiv (Cabello și colab., 1976; Novick și Schwesinger, 1976). În schimb, nu este sigur dacă sensibilitatea la incompatibilitatea manifestată de un alt plasmid se poate exprima în condiții în care sistemul replicativ propriu este blocat. Un alt aspect mult studiat se referă la relațiile dintre formele integrată și autonomă ale unui plasmid. S-a demonstrat incapacitatea plasmidului F autonom de a se replica în gazde Hfr, care poartă F integrat în cromozom (Dubnau și Maas, 1968). În schimb, într-un sistem similar, constituit dintr-un plasmid penicilinazic integrat în cromozomul *Staphylococcus aureus* și același plasmid autonom, s-a observat că rata replicării plasmidului autonom este doar puțin redusă față de cea din gazde care nu poartă un alt plasmid, deși plasmidul autonom era pierdut cu o rată de 10% per generație. În acest caz incompatibilitatea nu pare a implica controlul replicării, deși mecanismul acestui efect este departe de a fi clarificat (Novick și Schwesinger, 1976). În cazul relațiilor dintre cointegrate construite *in vitro* și plasmidele lor parentale, s-a observat o stringență mai redusă a incompatibilității față de plasmidul al cărui sistem de replicare este utilizat de cointegrat, decît față de celălalt parental (Cabello și colab., 1976).

Pe baza tuturor acestor date se poate sugera că incompatibilitatea între două plasmide este urmarea mai multor procese, cu aceeași specificitate, dar cu roluri preponderente în anumite situații. Astfel, pe de o parte, incompatibilitatea ar fi urmarea unui mecanism de control al numărului de copii care ar fi incapabil de a diferenția copiile

Scanned with OKEN Scanner

unor plasmide incompatibile, ceea ce ar duce la menținerea lor într-un număr total egal cu cel atins în celulele cu un singur plasmid. Acest mecanism ar putea juca un rol esențial în incompatibilitatea dintre plasmide integrate și autonome (Novick și Schwesinger, 1976). Pe de altă parte, în cazul plasmidelor autonome, omoloage la incompatibilitate, ar contribui și un al doilea proces, și anume distribuirea întîmplătoare a copiilor a două plasmide incompatibile coexistente, chiar în condițiile unei echipartiții. Conform acestui model, rata segregării din clone eteroplasmidice depinde doar de valoarea numărului de copii plasmidice/celulă (Novick și Hoppensteadt, 1978). Testarea experimentală a acestui model este în curs de realizare.

3. **Recombinarea plasmidică.** Două modalități de recombinare genetică au fost descrie la bacterii. Pe de o parte, recombinarea bazată pe omologii de secvență nucleotidică relativ întinse, care este considerată a implica procese de rupere și reunire a catenelor ADN și necesită intervenția unui sistem de recombinare generalizată. Pe de altă parte, așa-zisa recombinare nelegitimă, care nu necesită omologia genetică a secvențelor care interacționează, are în general un caracter situs-specific și nu implică sisteme de recombinare generalizată. În cazul plasmidelor se întîlnesc ambele tipuri de recombinare. Recombinarea de substituție între două secvențe omoloage purtate fie de două plasmide diferite, fie de un plasmid și cromozom nu pare să prezinte particularități față de recombinarea la nivelul unor gene cromozomale și ca urmare nu va fi discutată. Este doar de menționat că plasmidele fac posibilă construirea de tulpini eterozigote pentru o regiune genetică limitată, ceea ce asigură și un util mod de apreciere a eficienței sistemelor de recombinare generalizată ale gazdei. În ultimii ani s-au studiat mult două procese în care sînt implicate fenomene de recombinare: translocarea (transpoziția) de secvențe nucleotidice definite și amplificarea genică. Aceste procese, deși nu ar fi limitate la plasmide, au fost studiate în special în cazul lor.

1. *Translocarea.* Posibilitatea translocării unor secvențe care includ gene de rezistență purtate plasmidic a fost inițial sugerată prin descoperirea largii răspîndiri a unor astfel de gene pe o mare varietate de plasmide din diferite grupe Inc (Hedges și colab., 1974). Ulterior s-a demonstrat direct translocarea a diferite gene de rezistență la antibiotice de la un plasmid la altul sau pe cromozomul bacterian. Fenomenul de translocare este întovărășit întotdeauna de dobîndirea de către elementul receptor a unei cantități definite de material genetic, care prin analiză heteroduplex a fost demonstrată a avea în cazul fiecărui element transpozabil o secvență nucleotidică specifică. Studierea elementelor transpozabile identificate pînă în prezent a permis să se tragă cîteva concluzii asupra caracterelor generale ale acestui fenomen.

Scanned with OKEN Scanner

A) *Structura elementelor translocabile (transpozoni).* Elementele transpozabile raportate au dimensiuni între 2 și 13,5 × 10^6 daltoni. După structura lor, transpozonii pot fi împărțiți în două categorii: majoritatea prezintă la capete secvențe repetate în orientare inversă, în timp ce restul au secvențe repetate cu aceeași orientare. Majoritatea studiilor au fost făcute în cazul elementelor translocabile cu repetări inversate, cele două categorii de transpozoni fiind considerate a utiliza mecanisme diferite pentru transpozare. Repetările inversate a diferiți transpozoni studiați au lungimi între 140 și 1460 nucleotide și pot fi uneori constituite din secvențe de inserție (vezi subcap. C) binecunoscute.

B) *Caracterele procesului de translocare.* a) *Specificitatea integrării.* Transpozonii integrați la nivelul a diferite elemente genetice prezintă totdeauna aceeași structură, fără permutări circulare, astfel că integrarea implică un același situs specific de pe transpozon, situs aflat pe axa de simetrie a palindromului constituit din cele două repetări inversate.

S-a demonstrat capacitatea unui același transpozon de a se insera în același replicon la un mare număr de situsuri distincte. Totuși, distribuția situsurilor de integrare nu este complet întîmplătoare, existînd o tendință de grupare a lor în anumite regiuni ale genomului receptor (Kretschmer și Cohen, 1977). Un transpozon se poate integra la un același situs în ambele orientări posibile.

b) *Efectele la nivelul situsului integrării.* Integrarea este în general un fenomen precis, fără a provoca deleții la locul integrării. Producerea de deleții secundar integrării unui transpozon a fost totuși observată uneori, putînd fi atribuită inserării la situri plasate în apropierea unui alt element translocabil preexistent în genomul receptor (Stanisich și colab., 1977). Pe de altă parte, s-a demonstrat că după integrare, elementele translocabile favorizează producerea în regiunile adiacente lor a unor deleții care au un capăt la nivelul uneia dintre repetările inversate care delimitează transpozonul. Integrarea unui transpozon la nivelul unei gene structurale are efect mutațional, ducînd la inactivarea genei respective. În plus, cel puțin în cazul transpozonului TnA, s-a dovedit că integrarea într-un operon în una din orientări are caracter polar, afectînd și exprimarea genelor distale și s-a sugerat că în orientarea inversă TnA ar avea o secvență promotor foarte eficientă (Rubens și colab., 1976). Repetările inversate de la capetele elementelor transpozabile par a avea un rol ca situri preferențiale pentru fenomene de recombinare nelegitimă (Cohen și colab., 1978*). c) *Excizia transpozonilor.* Spre deosebire de integrare, excizia transpozonilor este în general imprecisă, ducînd fie la persistența unui fragment din transpozon la nivelul sitului respectiv, fie la excizia și de material adiacent (Davies și colab., 1977*). Acest fapt explică de ce majoritatea mutațiilor produse prin integrarea

Scanned with OKEN Scanner

de transpozoni nu dau revertanți sau revertează cu frecvențe extrem de reduse. În cazul unui transpozon integrarea și excizia constituie fenomene distincte, care au loc cu frecvențe diferite. Excizia de la un sit nu este în general întovărășită de inserția la un nou sit și integrarea la un nou sit nu necesită excizia de la un alt sit. d) *Eficiența translocării*. Există mari variații în eficiența de translocare a diferiți transpozoni, care ar depinde de transpozonul implicat, cît și de elementele genetice donor și receptor, dar nu de un sistem de recombinare generalizată. În general, frecvențele de transpoziție raportate au variat între 10^{-4} și 8×10^{-2} per element receptor. Într-un studiu cantitativ asupra eficienței translocării TnA, Kretschmer și Cohen (1977) au observat că frecvența translocării raportată per 10^6 daltoni material genetic al elementului receptor este de peste 10^3 ori mai mare în sisteme plasmid-plasmid și cromozom-plasmid, decît în cele plasmid-cromozom. Pe de altă parte, în timp ce frecvența translocărilor de la un plasmid la altul sau pe cromozom atinge valorile maxime după aproximativ 20 generații celulare, în sistemele cromozom-plasmid sînt necesare 50—100 generații pentru aceasta. Utilizînd același transpozon s-a demonstrat și un pronunțat efect de reducere a eficienței translocării la creșterea temperaturii. e) *Relații dintre transpozoni*. Recent, s-a demonstrat că prezența unui transpozon TnA integrat într-un element genetic reduce mult sau chiar împiedică integrarea ulterioară a unui alt TnA în același element. Ineficiența integrării TnA s-a observat și în cazul elementelor care poartă un alt transpozon, Tn10. În schimb, prezența TnA sau Tn10 în elementul receptor nu afectează eficiența translocării unui al doilea Tn10 pe același element genetic și deci fenomenul nu ar fi universal (Bennett și colab., 1977*).

C) *Relația dintre elementele transpozabile și secvențele de inserție*. O clasă de elemente cu proprietăți similare transpozonilor este constituită de așa-numitele secvențe de inserție (IS) (Starlinger și Stadler, 1976). Mai multe IS au fost identificate. Ele au dimensiuni mult mai reduse decît transpozonii, de numai 800—1400 nucleotide, și nu poartă gene care să se exprime în fenotipul gazdei. În rest însă, ele au numeroase caractere în comun cu transpozonii : capacitate de integrare la un mare număr de situri fără permutare circulară a materialului lor genetic și cu producerea de inactivări inserționale, iar în unele cazuri și de efecte polare într-una din orientări, favorizarea producerii de deleții în regiunile adiacente lor etc. Toate aceste date sugerează apartenența transpozonilor și IS la aceeași clasă de elemente genetice.

D) *Determinarea genetică a translocării*. Există însă puține date asupra modului în care transpozonii determină funcțiile necesare translocării lor. Datele obținute prin studierea capacității de translocare a unei serii de derivați deleționați izolați din TnA au demonstrat necesitatea pentru translocare a cel puțin două elemente : repetările

Scanned with OKEN Scanner

terminale inversate par a avea un rol de secvențe de recunoaștere în procesul de translocare, deleţiile la nivelul lor dînd un efect de blocare *cis*-dominant al translocării; regiunea centrală a transpozonului ar codifica cel puțin un produs difuzibil necesar translocării, deoarece deleţiile în această regiune determină o deficienţă în translocare care poate fi complementată de un transpozon normal prezent *in trans* (Heffron și colab., 1977). Nu se cunoaște funcţia produsului respectiv și nici dacă prezintă o interacţiune specifică cu repetările inversate ale aceluiași transpozon.

E) *Mecanismul translocării.* În cazul transpozonilor cu repetări inversate, s-a propus un mecanism de translocare în care un sistem enzimatic specificat cel puțin în parte de transpozon ar recunoaște specific secvențele repetate de la capetele transpozonului. Integrarea ar putea implica recunoașterea pe elementul receptor a unei secvențe scurte (4—6 nucleotide) și ca urmare relativ comune. S-a sugerat și posibilitatea ca integrarea să aibă loc nu la nivelul sitului de recunoaștere, ci în zona adiacentă lui, în mod analog acțiunii enzimelor de restricţie de tip I (Davies și colab., 1977*). Nu există nici o dată asupra naturii intermediarilor implicaţi în translocare.

F) *Semnificația biologică a procesului de translocare.* Deși pînă în prezent nu s-au evidențiat decît elemente translocabile care poartă determinanți de rezistență la antibiotice, nu există nici o raţiune ca să nu existe astfel de elemente care să determine și alte funcţii, dar care ar fi mai dificil de identificat. Existența de elemente translocabile asigură schimbul de informaţie genetică între specii bacteriene neînrudite, plasmidele cu spectru larg de gazde avînd în acest caz un rol de vectori. Existența transpozonilor explică modul în care au apărut plasmidele R cu rezistență multiplă la antibiotice (Kopecko și colab., 1978*), și pune la îndoială eficienţa unor abordări bazate pe eliminarea plasmidelor în încercarea de rezolvare a problemei rezistenţei la antibiotice a tulpinilor bacteriene.

2. *Amplificarea genică.* Un alt fenomen care implică recombinări sit-specifice este reprezentat de amplificarea genică, observată în cazul unor plasmide R. Un prim sistem este constituit de plasmidul NR1 în *P.mirabilis*. Așa cum s-a mai arătat, plasmidul NR1 este alcătuit din două componente RTF și r, la joncţiunile dintre ele găsindu-se două elemente IS1 cu acceeași orientare (Hu și colab., 1975). În condiţiile cultivării tulpinilor cu NR1 în mediu cu un antibiotic faţă de care plasmidul conferă rezistență se produce așa-zisul fenomen de tranziţie, cu trecerea de la forme RTF-r la forme RTF-poli-r, cît și mono- și polimeri-r (Rownd și colab., 1975*). Analiza fragmentelor obţinute prin tratament cu *Eco*RI și catagrafia prin denaturare parţială a moleculelor ADN cu dimensiuni foarte mari izolate din celule tranziţionate au confirmat prezența mai multor unităţi r în tandem. Rezultă că în aceste condiţii se produce o amplificare care

Scanned with OKEN Scanner

interesează întregul component r. În absența antibioticelor are loc fenomenul retrotranziției, cu revenirea la forma normală RTF-r. Prezența unei proporții reduse (0,1%) de celule tranziționate a fost observată și în absența antibioticelor, care au deci doar un rol selectiv în fenomenul tranziției (Hashimoto și Rownd, 1975). În cazul altui plasmid R, NR84, înrudit cu NR1, s-a demonstrat la cultivarea tulpinilor *P.mirabilis* care-l poartă, în mediu cu diferite antibiotice, amplificarea nu a întregului component r, ci doar a diferite fragmente din el. Aceste segmente au cel puțin la un capăt elemente IS sau repetări inversate de la capetele elementelor transpozabile. Cel puțin 9 situri diferite implicate în amplificare au fost identificate în cazul acestui plasmid (Rownd și colab., 1978*). Amplificarea genică a fost observată și în cazul genei de rezistență la tetraciclină (Tc) a plasmidului pAMα 1 de la *Str. faecalis*. Gena de rezistență la Tc este cuprinsă într-o secvență de $2,4 \times 10^6$ daltoni, care este flancată de repetări directe de $0,25 \times 10^6$ daltoni. În absența Tc în mediu se poate produce deleția din plasmid a unei unități de $2,65 \times 10^6$ daltoni care cuprinde regiunea rezistenței la Tc împreună cu una din repetările directe. La cultivare în mediu cu Tc apar molecule plasmidice mai mari cu repetarea în tandem a unității de $2,65 \times 10^6$ daltoni (Clewell și colab., 1978*). Din datele prezentate rezultă că o trăsătură comună a regiunilor amplificabile constă în prezența la capetele lor a unor secvențe repetate în aceeași orientare. Acest fapt a făcut să se propună un rol specific al acestor secvențe în amplificare, probabil ca locuri preferențiale pentru o recombinare sit-specifică. Deoarece secvențele terminale sînt omoloage, ar fi de așteptat intervenția sistemului de recombinare generalizată a gazdei în acest proces, ceea ce este susținut de unele date experimentale (Clewell și colab., 1978*). Intermediarul generat prin acest proces de recombinare ar fi o moleculă ADN dublu-catenară circulară care poartă una din secvențele repetate. Recombinarea ulterioară la nivelul acestei secvențe ar permite integrarea intermediarului în plasmide care poartă deja o unitate similară, ducînd la repetările în tandem observate în amplificare.

În cazul plasmidului NR1 s-a susținut, în plus, capacitatea de autoreplicare a componentului r amplificat, ceea ce ar asigura o și mai rapidă creștere în numărul de copii r care pot fi apoi integrate în tandem (Rownd și colab., 1975*). Deși s-a raportat existența unei origini replicative în componentul r, pînă în prezent nu s-au obținut date certe în favoarea capacității sale de autoreplicare. În orice caz, autoreplicarea nu constituie o cerință obligatorie în fenomenul de amplificare.

4. **Interrelații plasmid-celulă gazdă.** Plasmidele nu pot fi menținute în afara unei celule gazdă. După cum a reieșit din secțiunile anterioare, gazda intervine direct sau indirect în majoritatea proceselor care asigură stabilitatea ereditară a plasmidelor. Pe de altă parte,

Scanned with OKEN Scanner

plasmidele, prin determinanții lor somatici, asigură o largă gamă de noi proprietăți celulelor gazdă. Din multitudinea de interrelații plasmid-celulă gazdă, în secțiunea de față se vor trata doar două aspecte: 1) integrarea plasmidelor în cromozomul bacterian și 2) complexe neintegrate cromozom-plasmid.

1. *Integrarea plasmidelor în cromozom.* Mult timp plasmidul F a fost singurul cunoscut a fi capabil de o integrare eficientă în cromozomul *E.coli*. S-a evidențiat recent rolul elementelor IS prezente pe plasmidul F și cromozom în integrare. Interacțiunea dintre elementele IS de pe plasmidul F și cromozom ar duce la integrare fie printr-o recombinare pe baza omologiei asigurate de IS, fie prin procese independente de un sistem de recombinare generalizată, cu implicarea capetelor elementelor IS (Hu și colab., 1975). Al doilea mecanism ar avea o eficiență net mai redusă, frecvența integrării fiind de 10^3 ori mai mică în tulpini recombinare-defective decît în tulpini normale (DeVries și Maas, 1971). Ulterior s-a dovedit capacitatea de integrare în cromozomul de *E.coli* și a altor plasmide. Deoarece în aceste cazuri probabilitatea integrării este mult mai redusă, evidențierea s-a bazat pe fenomenul supresiei integrative: mutanții *dnaA(ts)* afectați în inițierea replicării cromozomului pot fi supresați pentru creșterea la temperatură nepermisivă de o serie de plasmide; supresia implică integrarea plasmidelor respective în cromozom și replicarea cromozomului sub controlul plasmidului, cel puțin la temperatură nepermisivă (Nishimura și colab., 1971). La *S. aureus* s-a raportat integrarea unui plasmid penicilinazic în cromozom, dependentă de prezența în celulă a unui anumit profag. S-a sugerat formarea unui complex plasmid-profag esențial pentru integrare (Schwesinger și Novick, 1975). Nu se cunoaște încă semnificația acestui mod de integrare și nu s-au raportat interacțiuni similare în alte specii bacteriene.

2. *Complexe neintegrate cromozom-plasmid.* Prin utilizarea unor metode blînde de liză a celulelor bacteriene care permit izolarea cromozomului într-o structură cît mai apropiată de cea *in vivo*, s-a demonstrat cosedimentarea unei fracțiuni din ADN plasmidic cu ADN cromozomal. Proporția din ADN plasmidic care este complexată cu cromozomul constituie o caracteristică a fiecărui plasmid. În general, această proporție este de aproximativ 90% la plasmidele cu număr redus de copii, dar numai cîteva procente, reprezentînd 1—2 copii/cromozom, în cazul plasmidelor cu număr mare de copii. S-a sugerat caracterul specific al complexării și, deoarece s-a observat o asociere preferențială cu cromozomul a intermediarilor replicativi și a monomerilor nou sintetizați, s-a atribuit acestor complexe un rol în replicarea ADN plasmidic. Totuși, cunoștințele actuale nu permit precizarea nici a bazei structurale și a mecanismului asocierii cromozom-plasmid, și nici a rolului său biologic (Kline și colab., 1978*).

Scanned with OKEN Scanner

5. **Semnificația biologică a plasmidelor.** Elementele extracromozomale asigură o importantă creștere în cantitatea de informație genetică a unei specii bacteriene, fără a face însă necesară purtarea întregului material genetic de către toate celulele. Prezența doar într-o minoritate din celulele unei populații bacteriene a unor plasmide capabile de a conferi avantaje selective față de un set specific de condiții este suficientă pentru a asigura supraviețuirea în condițiile respective. Posibilitatea transferului plasmidelor între celulele unei populații contribuie în această situație la înlocuirea populației plasmid-negative de către celulele care poartă plasmidul adecvat. Dintre proprietățile conferite de plasmide, rezistența la antibiotice a fost cel mai mult studiată datorită deosebitei sale importanțe medicale. Este astăzi bine stabilit că în majoritatea tulpinilor de origine clinică rezistența la antibiotice este datorată purtării de plasmide. Sub presiunea selectivă determinată de consumul mare (medical și nemedical) de antibiotice, plasmidele R cunosc o răspîndire tot mai largă, exprimată nu numai ca procentaj al tulpinilor unei specii care poartă astfel de plasmide, dar și ca număr de specii bacteriene cu semnificație medicală interesate în acest proces. Demonstrate inițial la enterobacterii și *S.aureus*, plasmidele R par a cuprinde mereu noi specii: *Str. faecalis*, *Hemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*. S-au obținut date care sugerează atît posibilitatea extensiei masei de plasmide R din bacteriile enterice la *H. influenzae* și *N. gonorrhoeae* prin depășirea barierelor biologice, cît și translocarea unor determinanți de rezistență de la plasmide care probabil nu se pot instala în noua specie la plasmide indigene (Falkow și colab., 1977*).

În concluzie, trebuie remarcat că studierea plasmidelor bacteriene prezintă interes din mai multe puncte de vedere: 1) datorită numărului mare de proprietăți bacteriene codificate de ele; 2) deoarece constituie un foarte util model în studierea replicării și segregării materialului genetic; 3) în ultimii ani și prin faptul că reprezintă vehicule preferate în experiențe de clonare ADN.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul XIV

MANIPULAREA GENELOR SAU CLONAREA GENICĂ

Contrar continuității evolutive a sistemelor vii, interschimbul genetic dintre diferitele specii în natură este limitat de numeroase bariere: macrostructurale de împerechere, instinctuale, etologice, nepotriviri cromozomale de sinaptizare sau de disjuncție, cît și incongruențe moleculare la nivelul ADN, ARN și al proteinelor (absența omologiilor dintre secvențele nucleotidice, nepotrivirea subunităților proteinice de a forma enzime oligo- sau multimerice active). Delimitarea între specii și cerințele social-economice, cît și setea de cunoaștere au determinat din cele mai vechi timpuri preocuparea omenirii de a recombina imaginativ calitățile viețuitoarelor potrivit nivelului cultural, fie misticofantastic (sfinx, minotaur, himeră), fie științifico-fantastic. Recombinarea genetică i-a inspirat pe geneticienii clasici să forțeze granițele interspecifice (Dobzhansky, 1951) la organismele superioare, dar interschimburile între specii neînrudite prin fecundații artificiale au condus la rezultate precare cu formarea de hibrizi sterili. Astfel, recombinarea de caractere avantajoase prin înlăturarea barierelor naturale taxonomice rămînea un vis, asemănător visului alchimiștilor de a săvîrși transmutația elementelor chimice și de a obține aur din orice metal. Și așa cum fizicienii și chimiștii au reușit în contemporaneitate, prin cunoașterea structurii nucleului atomic și a energiei sale fantastice, să realizeze visul de veacuri al alchimiștilor, în prezent cercetările de genetică moleculară reușesc să forțeze granițele dintre specii prin manipularea sau clonarea genelor.

Prin manipularea genelor sau clonare genică se înțelege mulțimea de metode și tehnici prin care se realizează clivarea ADN, îmbinarea acestuia într-o moleculă purtătoare capabilă să-l transfere de la un organism la altul neînrudit, unde își păstrează neștirbite calitățile sale informaționale, de a se replica și de a se exprima fenotipic (Cohen, 1975, Murray, 1976). Ca o ilustrare imediată a definiției, ADN uman purtător al informației pentru lanțul β al hemoglobinei (gena β^{Hb}) este integrat în genomul unui plasmid de *E.coli*, acesta este captat prin transformare în bacterii unde se multiplică și produce polipeptide β. Astfel, celulele de *E.coli* devin himere moleculare

Scanned with OKEN Scanner

formate din ansamblul molecular al bacteriei și molecule de om, realizîndu-se visul milenar al oamenilor privind îmbinarea în aceeași viețuitoare de calități și părți organice de la specii neînrudite. Este posibil ca termenul de manipulare (engl. *manipulation*), utilizat și în prestidigitație, să fie preferat de autori pentru a semnifica rezultatele surprinzătoare ale clonării genelor. Clonarea genelor s-a edificat pe baza cunoașterii căilor metabolice ale ADN, a structurii ADN, iar cheia acestei realizări constă din obținerea de extremități monocatenare complementare cu proprietăți adezive, la molecule ADN de proveniență diferită. Se realizează astfel omologii structurale sinaptizante inițiatoare ale recombinării, la molecule neomoloage de ADN, prin aceasta depășindu-se bariera moleculară a recombinării între specii neînrudite. Pentru îndeplinirea acestui deziderat, cît și a celor enunțate în definiție sînt necesare fie enzimele căilor de modificație-restricție descrise la bacterii, fie terminal-nucleotidil-transferaza izolată de la mamifere. Mai sînt necesare molecule purtătoare (molecule vector) de tip replicon, capabile să aibă replicare autonomă, și celule acceptoare corespunzătoare.

1. **Obținerea de extremități adezive prin endonucleaze restrictive și terminal-dezoxinucleotidil-transferaza (TdT-aza).** Pentru producerea de extremități adezive la molecule bicatenare de ADN sînt folosite două metode: utilizarea de endonucleaze restrictive și utilizarea de TdT-ază.

1. *Endonucleazele restrictive și sistemele de modificație-restricție la bacterii.* Aceste enzime au fost descrise în căile metabolice bacteriene implicate în degradarea ADN, avînd semnificația de control exercitat de celula gazdă față de transferul unui ADN străin, căi metabolice denumite de modificație și restricție (Arber și Linn, 1969). Modificația și restricția, descrise mai întîi la tulpinile B, K și C de *E.coli*, au fost apoi observate la diverse bacterii. S-a constatat, de exemplu, că fagul λ întreținut pe tulpina K, dacă este utilizat pentru infectarea tulpinii B, multiplicarea pe aceasta din urmă este cu mult inferioară decît pe celulele K de întreținere, deși injectarea de ADN fagic are loc cu aceeași eficiență. Fenomenul a fost numit restricție. În continuare, dacă puținii virioni obținuți din infecția celulelor B sînt refolosiți la infecția tot de celule B, acum multiplicarea lor este puternică, iar mărimea exploziei fagice este normală. S-a presupus că fagul λ trecut în serie pe B a fost modificat să se poată multiplica pe B iar fenomenul a fost numit modificație (fig. 106). Fagii cu modificație de tip B se comportă însă restrictiv față de K, tulpina gazdă de origine. S-a observat că restricția se datorează unor enzime care clivează ADN în segmente mari și au fost numite endonucleaze restrictive iar modificația se datorează unor metilaze care leagă grupări metil la nivelul ADN macromolecular și produc în particular 6-metil

Scanned with OKEN Scanner

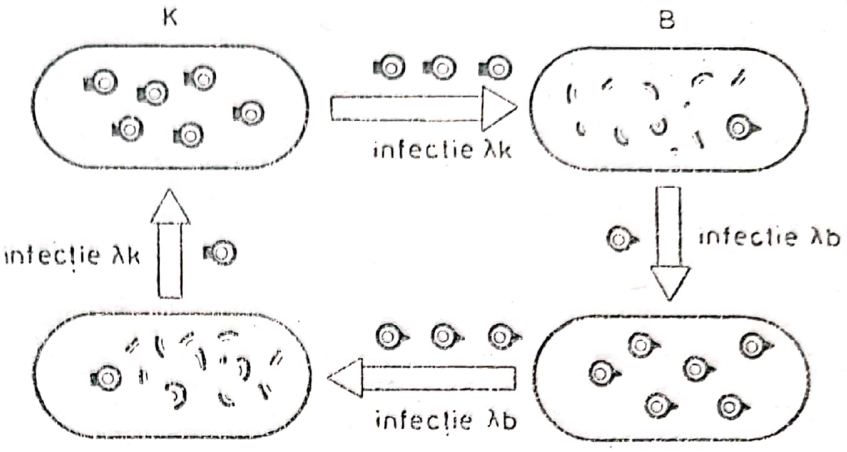


Fig. 106. **Modificație și restricție în infecția cu fag λ.** Cercurile mici reprezintă genomi de fag λ v. K și B, tulpini clasice de *E. coli* folosite în analize genetice. Rb = restricție B provocată de o endonuclează specifică B care fragmentează genomii fagici multiplicați pe tulpina K. Un genom fagic nu este fragmentat în celula B, deoarece este modificat în situl enzimei de restricție B sub acțiunea unei metilaze B corespunzătoare (Mb). Genomul v modificat B(λb) este multiplicat normal (nerestrictiv) pe celule B, dar a devenit sensibil la restricția de tip K. Pentru a se putea multiplica pe celule K trebuie să treacă printr-o modificație Mk etc.

aminopurină (6-metil-A) și 5-metil citozină (Smith și colab., 1972). ADN propriu unei celule este protejat prin modificație față de endonucleazele sale de restricție, fiecare enzimă de restricție avînd și metilaza antitetică de modificație. Sisteme de acest fel au fost observate apoi la toate modalitățile de transfer genetic bacterian (transformare, transducție, conjugare). Endonucleazele de restricție (tabelul 15) recunosc situri cognitive din ADN formate din 4, 5 sau 6 perechi bazice, au specificitate pentru structura bicatenară și solicită în general prezența ionului de magneziu, de aceea efectele lor endonucleolitice sînt blocate prin adăugarea de EDTA. Fiecare enzimă are un sit cognitiv a cărui specificitate rezidă în secvența perechilor nucleotidice care prezintă bisimetrie rotatorie palindromică (cap. III, X). La toate moleculele de ADN, indiferent de proveniența taxonomică, siturile tetra-nucleotidice se repetă întîmplător tot la aproximativ 250 de perechi nucleotidice iar siturile hexanucleotidice se repetă la 4000 de perechi în mod obișnuit (Murray, 1976). De la această regulă sînt multe excepții. Endonucleazele restrictive cunoscute pînă în prezent se împart în două grupe: a) de secționare bicatenară nedecalată; b) de secționare bicatenară decalată.

a) *Endonucleaze restrictive de secționare bicatenară nedecalată* (tabelul 15, primele trei poziții). Au greutăți moleculare mici, sînt oligomere formate din subunități identice, nu cer cofactorii ATP și S-adenozil metionină pentru acțiune. Efectul lor constă în ruperea de legături fosfodiesterice în poziția 3′ și aflate față în față, la nivelul axului

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 15

Cîteva endonucleaze restrictive utilizate în clonarea de gene (după Murray, 1976, Collins, 1977, catalogul Sigma 1977). Nr. segm λ = numărul de segmente de ADN rezultate din tratarea genomului de fag cu enzima referită. Săgeţile verticale indică legătura clivată. N = oricare nucleotid. Pi = oricare pirimidină. Pu = oricare purină.

Enzima	Siturile cognitive specifice din ADN bicatenar	Nr. segm. λ	Extremităţi adezive după clivaj	Tulpina de origine
Alu I	3′—..—NAG↓CTN—..—5′ 5′—..—NTC↑GAN—..—3′	50	—	*Arthrobacter luteus*
Hae III	3′—..—NGG↓CCN—..—5′ 5′—..—NCC↑GGN—..—3′	50	—	*Haemophillus aegypticus*
Hind II	3′—..—GTPiPuA↓CN—..—5′ 5′—..—CAPuPiT↑GN—..—3′	34	—	*Haemophillus influenzae.*
EcoR I	3′—..—C↓TTAAG—..—5′ 5′—..—G↑AATTC—..—3′	5	—TTAA AATT—	*E.coli* Ry 13
EcoRI*	3′—..—N↓TTAAN—..—5′ 5′—..—N↑AATTN—..—3′	5	—TTAA AATT—	*E.coli* Ry 13d
EcoR II	3′—..—N↓GGTCCN—..—5′ 5′—..—NCCAGGN—..—3′		—GGTCC CCAGG—	*E.coli*
Hind III	3′—..—T↓TCGAA—..—5′ 5′—..—AAGCT↑T—..—3′	6	—TCGA AGCT—	*Haemophillus influenzae* Rd
BamH-1	3′—..—C↓CTAGG—..—5′ 5′—..—GGATC↑C—..—3′	5	—CCTAG GATCC—	*Bacillus amyloliquefaciens*
Hha I	3′—..—NGC↓GCN—..—5′ 5′—..—NCG↑CGN—..—3′	50	—GCG CGC—	*Haemophillus haemolyticus*
Sal I	3′—..—G↓TCGAC—..—5′ 5′—..—CAGCT↑G—..—3′	2	—TCGA AGCT—	*Streptomyces albus*

de simetrie a sitului. De aceea ruperea este nedecalată, transversală, nu dă extremităţi monocatenare. În prezent au fost găsite multe enzime de acest tip ca un rezultat al progreselor tehnice în izolarea şi depistarea lor şi nu datorită sistemelor de modificaţie-restricţie în care ar putea fi implicate (Collins, 1977).

b) *Endonucleaze restrictive cu secţionare bicatenară decalată* (tabelul 15, ultimele şapte poziţii). Au greutate moleculară mare, sînt

Scanned with OKEN Scanner

proteine oligomerice globulare formate din subunități diferite, pentru activitatea lor solicită cofactorii ATP și S-adenozil metionina. Rup legăturile fosfodiesterice în ambele catene, dar situate la extremitățile simetrice ale sitului cognitiv. Ca urmare, aceste enzime produc crestări monocatenare decalate de lungimea sitului cognitiv, la distanță egală de axul simetriei rotatorii al fiecărui sit. Acest decalaj de crestare determină ca ADN crestat să-și mențină structura prin legăturile de hidrogen intrasit în condițiile temperaturilor joase (+4°). La valori termice mai ridicate (+30—+37°) la care enzimele sînt și mai active, împerecherile de joasă energie se desfac și rezultă segmente moleculare bicatenare la capetele cărora se găsesc extremități adezive monocatenare lungi de 3, 4 sau 5 nucleotide, lungimea acestora depinzînd de enzimă (tabelul 15). Acest grup de enzime este cel mai interesant pentru manipularea genelor din următoarele motive: acționează asupra oricărei categorii de ADN care prezintă situri cognitive; toate categoriile taxonomice de ADN testate au astfel de situri cognitive; la toate categoriile de ADN asupra cărora acționează produc segmente cu aceleași extremități adezive, prin aceasta realizîndu-se condiția ca segmente neomoloage genetic să aibă extremități sinaptice omoloage. În consecință, endonucleazele restrictive cu efect decalat sînt factori care produc segmente mari de ADN de talia genelor sau a grupurilor de gene care pot fi îmbinate prin extremitățile adezive practic în orice ordine. Această îmbinare este destul de stabilă prin păstrare la +4° sau poate fi și mai stabilizată prin tratare cu ligază care completează discontinuitățile asemănătoare crestăturilor, rezultate după îmbinarea prin împerecheri bazice ale extremităților adezive (fig. 107). Endonucleazele restrictive sînt enzime neimplicate pînă în prezent în recombinările genetice naturale, au fost descrise numai la bacterii, sînt distincte de nucleazele de recombinare sau de export. Progresele mari în cunoașterea lor se datorează în general îmbunătățirilor aduse în tehnicile de extracție și purificare, printre care mai importante

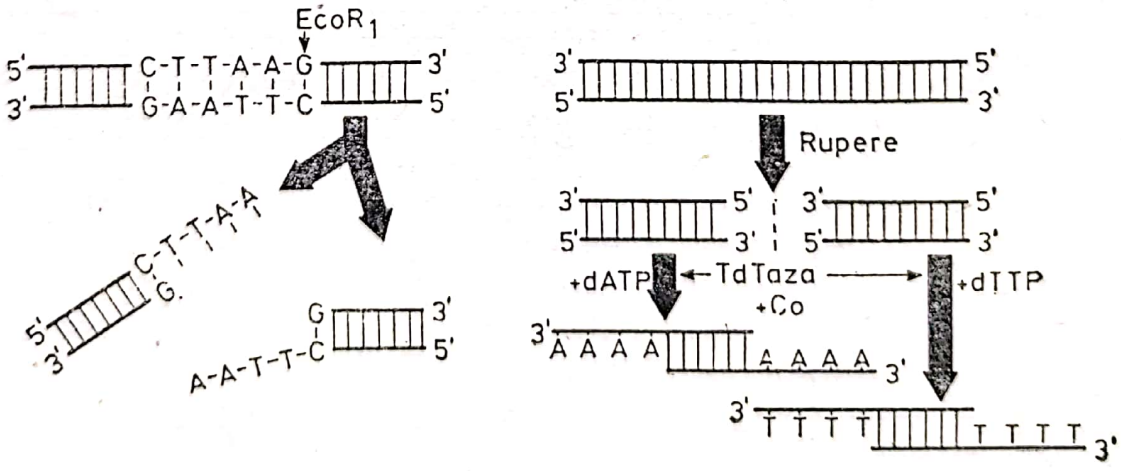


Fig. 107. Ilustrarea grafică a producerii de extremități adezive prin endonuclează restrictivă (stînga) și prin TdT-ază.

Scanned with OKEN Scanner

sînt următoarele: 1) folosirea de substanţe tampon cu valori pKa foarte apropiate de cifrele de *p*H optimal reacţiilor dorite şi care au în consecinţă mare capacitate tamponantă (Tris, HEPES, PIPES, MOPS etc.); 2) efectuarea tuturor manevrelor de purificare la temperaturi scăzute (baie de gheaţă, camere frigorifice); 3) folosirea cromatografiei pe coloană de fosfoceluloză care are afinităţi avantajoase pentru enzimele nucleare; 4) preparate standard de ADN cu greutate moleculară înaltă ca martori de depistare a activităţii enzimelor (ADN de fag λ); 5) folosirea electroforezei în gel de agaroză pentru identificarea mărimii fragmentelor de ADN obţinute pentru depistarea nivelului de degradare produs de oricare enzimă.

2. *TdT-aza şi formarea de extremităţi adezive.* TdT-aza, denumită şi ADN-nucleotidil-exotransferaza, a fost izolată prima dată de Bollum din timus de viţel. S-a constatat apoi că poate fi găsită în mod normal numai în timocitele de densitate medie din cortexul timic şi în măduva osoasă hematopoetică (Goldschneider şi colab., 1977). În stări patologice a fost izolată de la bolnavi cu leucemie acută limfocitară şi alte leucemii limfocitare derivate din limfocitele T, nefiind găsită în limfocitele de tip B normale sau neoplazice. TdT-aza are proprietatea să adiţioneze, prin legături fosfodiesterice succesive, dNTP la extremitatea 3′ cu oxidrilul liber, la fiecare ADN rupt prin agitare sau prin activitate endonucleazică. Este stimulată de ionii de magneziu şi de prezenţa unei proeminări din structura bicatenară a extremităţii 3′ cu cel puţin 3 dezoxinucleotide. Proeminenţe 3′ pot fi provocate prin tratamente scurte ale ADN bicatenar cu exonuclează λ (cap. XI). Efectuarea adiţiei cu dNTP de acelaşi fel (de exemplu, dATP) are ca efect producerea de extremităţi homopolimerice 3′ cu lungimea de aproximativ 100 de dezoxinucleotidili (fig. 107). Înlocuirea magneziului cu ionul de cobalt îi creşte activitatea la extremităţi 3′ neproeminente şi îi permite să adiţioneze homopolimeri la eventuale crestături din ADN bicatenar şi să rezulte structuri ramificate. Pentru prepararea de extremităţi adezive (complementare) în scopul producerii de molecule recombinant, cele două specii de ADN de îmbinat sînt tratate separat cu TdT-ază în prezenţa de dNTP complementari. De exemplu, ADN uman + TdT-ază + + dATP şi ADN liniar de fag λ + TdT-ază + dTTP. După reacţiile de polimerizare terminală ADN uman bicatenar are cîte o „coadă" de poli (dA)3′ la fiecare capăt iar ADNλ, cîte o „coadă" de poli (dT)3′ la fiecare capăt. Cele două tipuri de prelungiri monocatenare sînt complementare şi adezive (engl. *coezive tails*) şi prin incubaţie lentă (la +22°) a unei mixturi din cele două tipuri de ADN se formează structuri recombinant care pot fi stabilizate prin tratare cu ligază sau întreţinute prin păstrare la +4°. Metoda cu TdT-ază a fost utilizată mai puţin.

Scanned with OKEN Scanner

2. **Moleculele vectoare sau purtătoare pentru clonarea de gene.** Segmentele de ADN purtătoare de extremităţi adezive captate ca atare în celule acceptoare printr-un procedeu asemănător transformării clasice au puţine şanse de a se integra în genomul celulei gazdă şi de a deveni funcţionale (capabile să se replice şi să aibă expresie genică). În consecinţă, s-a ivit necesitatea de a le recombina aprioric captării celulare, într-o altă moleculă de ADN dotată cu proprietăţi care realizează facilitarea captării în celulele acceptoare, menţinerea lor intracelulară, multiplicarea şi expresia genică. Cu alte cuvinte, segmentul de ADN vizat în experienţă trebuie îmbinat într-un sistem autonom de replicare şi transcriere (replicon) care să-i asigure formarea unei populaţii de segmente de acelaşi fel, adică formarea unei clone moleculare. Aşa se explică şi denumirea de clonare a genelor. Moleculele de ADN capabile să integreze segmente de ADN genetic neomoloage şi să le multiplice în sisteme celulare asigurîndu-le şi expresia genică se numesc purtători genici sau vectori. Un vector genic trebuie să îndeplinească următoarele condiţii: a) Să aibă situri cognitive pentru endonucleaze restrictive în regiuni genetice a căror exprimare să nu condiţioneze multiplicarea sa în celula gazdă şi ca urmare secţionarea lui să nu dăuneze funcţiilor de replicare şi transcriere; b) Siturile cognitive de scindare să fie cît mai puţine pentru ca tratarea cu enzima restrictivă să nu producă degradări exagerate care ar diminua posibilitatea unui control al fixării segmentelor de ADN pe cale de clonare; c) Să fie mic în raport cu mărimea medie a repliconilor pentru a avea loc de integrare a segmentelor de clonat şi pentru a facilita captarea în celulele acceptoare; d) Să poată fi uşor obţinut în stare pură din homogenate celulare, în preparate fără enzime ale recombinării sau degradării ADN. Prezenţa acestora constituie impedimente majore pentru realizarea clonării, deoarece sînt factori scăpaţi de sub control care ar altera segmentele preparate; e) Să fie capabil de replicare autonomă şi de transcriere în celulele acceptoare gazdă (cele mai utilizate sînt celulele de *E.coli*); f) Să codifice în celula gazdă caractere care să permită recunoaşterea acesteia şi îmbogăţirea ei selectivă. De exemplu, să confere celulelor care l-au acceptat rezistenţă la antibiotice sau proprietăţi fermentative pe care celulele neacceptoare nu le au. Toate aceste condiţii majore necesare unui vector molecular sînt îndeplinite de plasmidele bacteriene (cap. XIII) şi în particular de plasmidele de la *E.coli*, cît şi de bacteriofagii lambdoizi cu comportări asemănătoare plasmidelor. Cele mai utilizate molecule vector sînt derivate din plasmidele de rezistenţă la antibiotice, plasmidul col E1 producător de colicină E1, genomul fagului λ, factorul F. Vectori moleculari au mai fost derivaţi din plasmidele de *Pseudomonas* (derivaţi ai factorului P), plasmide de *Proteus* şi plasmide de stafilococ. În general, plasmidele de tip sălbatic nu îndeplinesc toate condiţiile unui bun vector, de aceea prin

Scanned with OKEN Scanner

proceduri genetice de mutaţii şi recombinări (cap. XI, XII, XIII) s-au obţinut : a) eliminarea siturilor cognitive multiple de endonucleaze restrictive şi realizarea de vectori moleculari cu cîte un singur sit pentru o enzimă dată situat într-o regiune genetică dispensabilă replicării şi transcrierii vectorului ; eliminarea unei părţi din genomul plasmidic prin deleţii repetate ; introducerea de gene codificatoare ale unor caractere folositoare fie în recunoaşterea, segregarea şi îmbogăţirea celulelor care l-au acceptat, fie în multiplicarea selectivă a vectorului în celula gazdă. De exemplu, plasmidul vector pSC101 derivat din plasmidul R6, are greutatea moleculară de două ori mai mică, are un singur sit de clivaj cu *Eco* RI, un singur sit cu SalI, poartă gena codificatoare a rezistenţei la tetraciclină, clivajul cu *Eco*RI nu-i alterează capacitatea de replicare autonomă şi nici capacitatea de a induce rezistenţa la tetraciclină. Un exemplu interesant de construirea vectorilor de clonare îl constituie vectorii derivaţi din genomul bacteriofagului λ. De exemplu, vectorul λ*dV* are un singur sit de clivaj pentru endonucleaza BamH-l iar genomul λ de tip sălbatic are cinci situri (tabelul 15). Greutatea moleculară a lui λ *dV* este de şase ori mai mică, conferă imunitate faţă de infecţia cu bacteriofag şi are capacitatea de replicare autonomă. Plasmidul ColEl are proprietăţi native deosebite. Greutatea moleculară este mică pentru un replicon ($4{,}2 \times 10^6$d), are un singur sit de clivaj pentru *Eco*RI situat în gena codificatoare de colicină specifică. După secţionare şi integrarea unui segment de clonat, plasmidul vector nu mai codifică producţia de colicină în celula gazdă, în schimb îşi păstrează capacitatea de a induce imunitatea la colicina El şi de a se replica producînd 20 de copii pe celulă. Acest plasmid are capacitatea ca după captare să se replice independent de sinteza proteinelor iar adăugarea de cloramfenicol îi accelerează replicarea încît în 7—12 ore produce cîteva sute de copii cînd este purtător al unei gene de clonat şi 1000 de copii cînd este nepurtător (Clewell, 1972). Pînă în prezent sînt descrişi zeci de vectori (Collins, 1977) iar lista lor prezintă creşteri anuale considerabile.

3. **Formarea exocelulară a moleculelor recombinant-prelucrare necesară manipulării de gene.** Deoarece segmentele de ADN (sau genele) de clonat trebuie integrate într-o moleculă vector, este clar că o prelucrare obligatorie a manipulării genice constă din formarea exocelulară a recombinantului molecular. În conformitate cu cele descrise, moleculele recombinant, vector genic-genă de clonat, se obţin prin producerea de extremităţi adezive fie pe calea endonucleazelor restrictive, fie pe calea TdT-azei. Înainte de utilizarea enzimelor de producere a extremităţilor adezive este necesară obţinerea în stare pură atît a ADN vector cît şi a ADN de clonat. ADN vector poate fi obţinut cu uşurinţă datorită metodelor de multiplicare repli-

Scanned with OKEN Scanner

cativă în celula gazdă și a diferențelor fizice nete între ADN plasmidic și ADN celular. Dacă manipularea genică se referă la gene bacteriene sau gene ale altor plasmide decît cele vectoare problema este mai simplă datorită complexității mai mici a acestor genoame. Dar la organismele superioare, la care o genă structurală nerepetitivă se află în amestecul de ADN într-o diluție de 10^{-6} sînt necesare metode speciale de îmbogățire înainte de a o angaja în recombinare. Pentru genele repetitive (genele histonice, genele ribozomale) există o îmbogățire naturală a frecvenței lor în amestecul de ADN total (cap. III). Pentru genele structurale unice sînt necesare tehnici de îmbogățire fie utilizînd un șir de metode, ca electoforeza preparativă în gel de agaroză, hibridizări cu ARNm specific genei de clonat pentru recunoașterea fracțiunii electroforetice purtătoare, denaturarea ADN a acestei fracțiuni și îmbogățirea pe filtre de nitroceluloză. O tehnică frecvent folosită constă din izolarea și purificarea de ARNm specific genei structurale și folosirea acestuia ca matriță pentru sinteza de ADN complementar (ADNc) prin transcriere inversă (Marks și colab., 1974) (cap. V). ADNc monocatenar obținut prin denaturare este apoi bicatenarizat prin sinteză catalizată de polimeraza I de *E.coli*. O altă metodă constă în serii de secționări a ADN-total cu un set de endonucleaze restrictive, intercalate cu separare de fragmente prin electroforeză și testarea celor din urmă prin hibridizări cu ARNm specific genei de clonat după o prealabilă denaturare a probei. Pentru a înlătura riscul ca gena de clonat să aibă situri cognitive interne pentru endonucleazele restrictive și să fie inactivată, se raportează secvența aminoacidică a proteinei corespunzătoare la secvența dezoxinucleotidică din gena vizată cu ajutorul unei metode computerizate știindu-se în prealabil dacă gena de clonat are riscul de a fi inactivată de enzimele restrictive de utilizat (Collins, 1977).

4. **Etapele manipulării genice și celulele acceptoare pentru captarea și amplificarea clonală.** Cele două metode de obținere a extremităților adezive impun două căi diferite de producere a moleculelor recombinant: calea endonucleazelor restrictive decalate; calea TdT-azei. Ambele căi se termină prin etape comune endocelulare care se desfășoară la nivelul celulelor acceptoare.

1. *Calea endonucleazelor restrictive decalate.* Atît plasmidul vector, cît și ADN străin de încorporat sînt tratați cu enzima restrictivă selectată potrivit sistemului ales. Celor două categorii de ADN li se produc extremități adezive; amestecul lor are ca efect interacțiunea extremităților adezive prin împerecheri specifice (A—T, G—C) formîndu-se un intermediar destul de labil la temperatura camerei caracterizat prin prezența a patru întreruperi catenare decalate. Prin folosirea ligazei, cele patru crestări sînt desființate și se obține o mole-

Scanned with OKEN Scanner

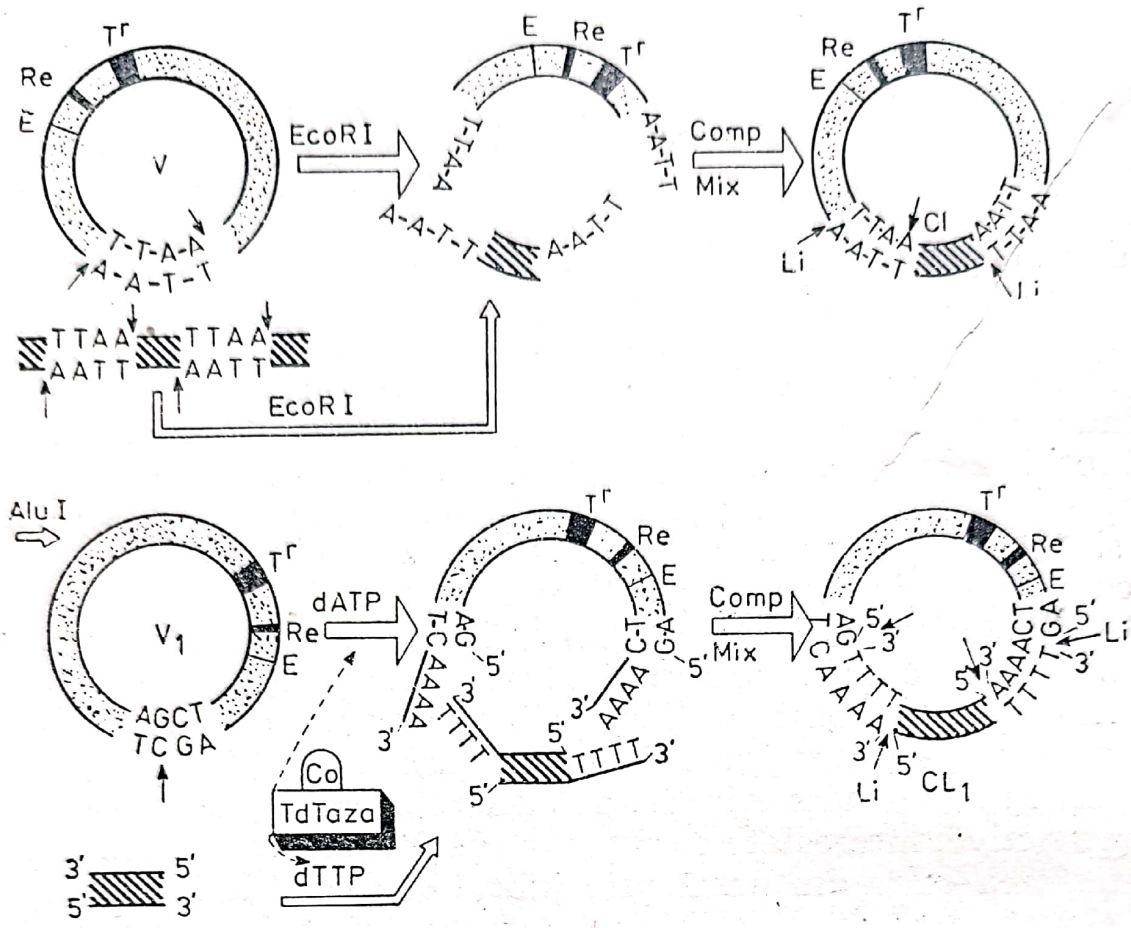


Fig. 108. **Obținerea de plasmide recombinant prin metoda endonucleazelor restrictive (sus) și a TdT-azei (jos).** E = elemente genetice care asigură expresia genică (promotor, operator). Re = gene pentru replicarea autonomă. T^r = gena pentru tetraciclin rezistență. V, V_1 = plasmide vectoare. Comp = împerecheri specifice prin extremități adezive monocatenare. Mix = amestecarea moleculelor vector și de clonat. Li = ligaza. Co = clorură de cobalt. Și moleculele recombinant nelegate de ligază (în cerc deschis) pot fi folosite în transformare; acestea sînt completate intracelular cu legarea covalentă sub acțiunea ligazei de gazdă acceptoare.

culă recombinant formată din molecula plasmidică și ADN străin (fig. 108).

2. *Calea TdT-azei.* ADN plasmidic circular cît și ADN de clonat sînt tratați cu o enzimă restrictivă nedecalată potrivită vectorului (vector cu sit singular). ADN de clonat poate fi rupt și prin mijloace mecanice (cum dealtfel se și produce în tehnicile obișnuite de extracție). Ambele categorii sînt apoi tratate scurt cu exonuclează λ pentru a obține proeminențe scurte de extremități 3′. Acest tratament nu-i necesar dacă se adaugă 1mM ion de cobalt (fig. 108). În ambele probe de ADN se adaugă TdT-ază și dNTP complementari. De exemplu, la ADN vector se adaugă dATP iar la ADN de clonat, dTTP. Se sintetizează extremități monocatenare poli(dA)3′ și respectiv poli(dT)3′. Cele două probe se amestecă și se așteaptă „călirea", adică împerecherea specifică la temperatura camerei obținîndu-se intermediarul labil și apoi fie se tratează cu ligază pentru consolidarea recombinan-

tului molecular, fie se utilizează ca atare pentru captarea intracelulară. Moleculele recombinant sînt numite și molecule himere (gr. *himera* = ființă mitologică imaginară cu cap de leu, trunchi de capră și coadă de șarpe). Metoda TdT-azei este mai puțin utilizată în clonări genice. Oricum, ambele metode nu obțin exocelular și clonarea moleculară (multiplicarea unui recombinant molecular pur pînă la obținerea unei populații de molecule identice). Acest lucru se realizează în etape endocelulare comune ambelor căi.

3. *Etapele celulare comune, clonarea recombinanților moleculari prin selecție, segregare și clonare celulară.* Recombinanții moleculari obținuți *in vitro* sînt eterogeni iar diversitatea lor depinde de gradul de omogenitate a genelor de clonat. Obținerea unui grad înalt de puritate este dificil, solicită multe etape de purificare, solicită sinteză de gene pure, acțiuni mai greu de realizat. Oricum, gradul înalt de puritate a genelor de clonat este dispensabil, deoarece în etapele celulare ale manipulării genice se pot obține clone moleculare diferite prin tehnici de selecție-segregare și îmbogățire, în principiu asemănătoare îmbogățirii și selecției unei bacterii patogene din amestecul de bacterii aflat într-un produs biologic de diagnostic. Din această asertiune rezultă și natura celulelor folosite pentru manipulări genice. Acestea sînt celule bacteriene iar pînă în prezent au fost utilizate în majoritatea cazurilor diferite tulpini de *E. coli*.

Etapele celulare sînt următoarele: transformarea, selecția transformanților, segregarea și clonarea transformanților purtători ai moleculelor recombinant urmărite, îmbogățirea și întreținerea lor.

a) *Transformarea celulelor de E. coli acceptoare în manipulările genice este asemănătoare transfecției.* Transformarea clasică, prima modalitate de transfer genetic descrisă la bacterii, cuprinde captarea de ADN în celula gazdă și integrarea acestuia în genomul acceptor (cap. I și XI). În cazul manipulării genelor, ADN recombinant construit *in vitro* este captat de celulele gazdă competente. Captarea însă nu mai este urmată de integrare în genomul celulei acceptoare, deoarece ADN recombinant este un plasmid himeric dotat cu calități repliconice: se replică (multiplică) autonom în celula gazdă și este capabil de expresie genică independentă de genomul celular. Ca urmare, celula care l-a acceptat dobîndește caractere noi, codificate de plasmidul himeric și devine fenotipic la rîndul ei o himeră. În diviziunile celulare ulterioare celula transformant inițială transmite întregii progenii și plasmidele himerice și formează o clonă celulară care, simultan clonează și molecula recombinant. Absența integrării cromozomale determină ca transformarea din manipularea genică să fie semnificativ asemănătoare transfecției, fenomen descris clasic la virusuri. În transfecție acidul nucleic viral purificat este captat de celula gazdă, nu este integrat în genom, iar capacitățile repliconice proprii îi permit să se multiplice, să codifice proteinele virale

Scanned with OKEN Scanner

și să formeze virusuri întregi eliberate prin liza celulei. Spre deosebire de transfecție, transformarea manipulării genice este efectuată cu molecule plasmidice selectate și construite prin metode genetice pentru a nu produce prejudicii ciclului celular normal, ci mai mult pentru a conferi acestuia avantaje selective în condiții de mediu improprii celulelor netransformate. Condițiile de bază ale transformării de manipulare la *E. coli* au fost descrise de Mandel și Higa (1970) care au descoperit că adăugarea ionului de calciu în mediul de transformare condiționează eficiența captării ADN de bacteriofag. Ulterior, majoritatea procedeelor de transformare cu plasmide himerice au fost fie identice, fie derivate asemănătoare metodei inițiale (Cohen și colab., 1973; Collins, 1977). Într-o populație de celule coliforme făcute competent și puse în contact cu plasmidele himerice, numai un număr mic de celule de ordinul 10^{-5}—10^{-6} devin transformanți (captează și menține recombinantul molecular) (Cohen, 1975). Din acest motiv, pentru clonare este necesar să se efectueze etape de îmbogățire, selectare și segregare pentru a obține clona celulară himerică.

b) *Etapele de selectare, segregare și îmbogățire a transformanților cu plasmidul recombinant.* Posibilitățile de selecție a transformanților din masa predominentă de celule netransformate sînt furnizate tot de caracterele codificate de plasmidul vector. Majoritatea vectorilor au gene care conferă bacteriilor-transformanți fie rezistență la antibiotice (cloramfenicol, ampicilină, tetraciclină etc.), fie imunitate față de efectul bactericid al colicinei E—1, fie imunitate la infecția cu bacteriofagi. După captare, plasmidele recombinant intră în ciclul de expresie genică (transcrieri de ARNm → traducere de proteine specifice) și dotează transformanții cu noile caractere. Ca urmare, ulterior captării, populația de celule în care sînt și transformanții himerici este inoculată pe medii în care se află încorporați presorii selectivi (fig. 109). Aceștia fie inhibă, fie omoară populația de celule sensibile și permit creșterea transformanților sub formă de colonii. Fiecare colonie este o clonă, deoarece datorită rarității transformanților este practic sigur că unitatea formatoare de colonii este o celulă singulară. Pasajul ulterior al unei colonii produce o populație clonată de transformanți care poate fi apoi multiplicată teoretic indefinit. Deoarece fiecare celulă poartă și plasmidul recombinant, atunci pe toată populația s-a obținut și clonarea ADN recombinant, ceea ce reprezintă de fapt și scopul metodelor aplicate. Unii vectori sînt dotați cu gene codificatoare pentru două sau mai multe caractere selective (de exemplu, rezistența la tetraciclină și ampicilină sau imunitatea la colicină + rezistența la kanamicină), ceea ce lărgește potențialul de selecție. Lărgirea potențialului selectiv folosește și alte proprietăți codificate fie de vectorii moleculari, fie de celulele gazdă într-o metodologie mai complexă descrisă în literatura citată.

Scanned with OKEN Scanner

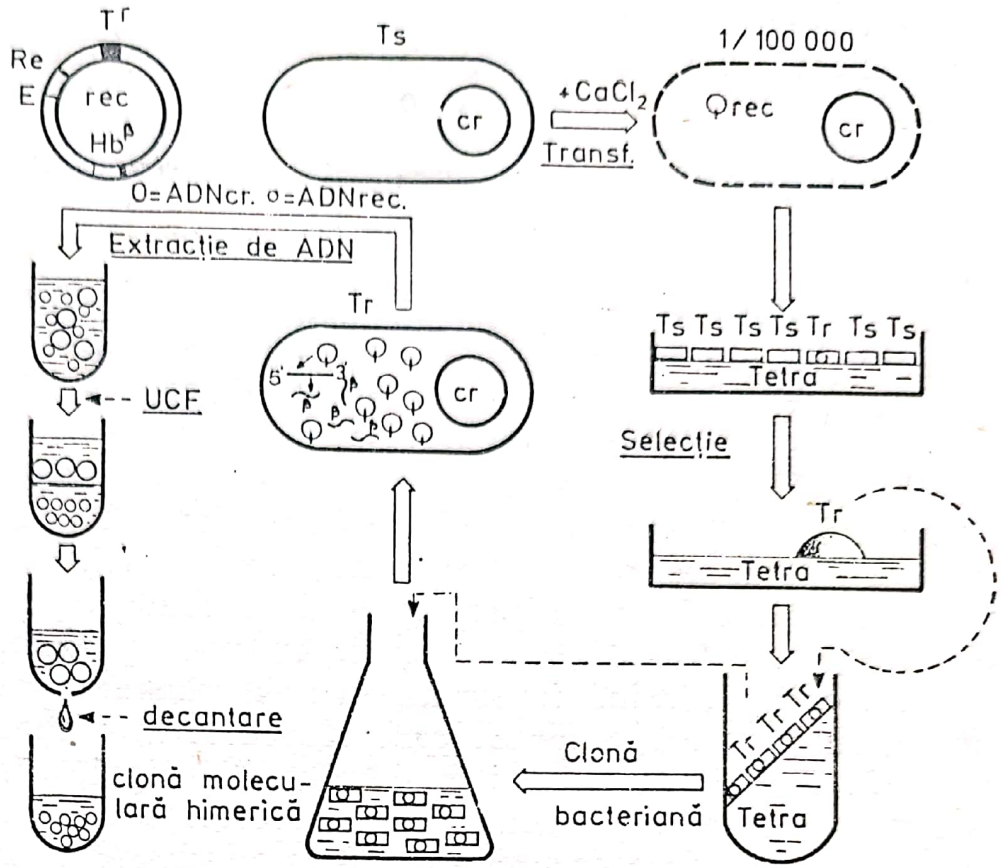


Fig. 109. **Clonarea unei gene prin manipulare în celule de E.coli.** T^r = gena de tetraciclin rezistență. Tr = tetraciclin rezistența. Ts = celule tetraciclin sensibile. Hbβ = gena pentru polipeptidul β din hemoglobina A umană. β = lanț polipeptidic de Hb umană. Transf. = transformare. UCF = ultracentrifugare în gradient de clorură de cesiu. Săgeți întrerupte = treceri pe medii. Tetra = tetraciclină. cr = cromozom bacterian. rec = plasmid recombinant obținut prin metodele redate în fig. 108 (ilustrare inspirată după Cohen, 1975).

5. **Multiplicarea genică asigurată de vectori.** Majoritatea vectorilor plasmidici se caracterizează prin replicarea mai rapidă decît a cromozomului din celula gazdă, ceea ce determină ca în fiecare celulă să existe mai multe copii ale aceluiași plasmid. Această proprietate rămîne și după integrarea segmentului de ADN de clonat, deși creșterea în lungime poate să reducă numărul de copii. Oricum, reducerea nu anihilează multiplicarea asigurată de proprietățile vectorului și în consecință în fiecare celulă din clona transformantă există mai multe copii ale ADN recombinant și implicit ale genei străine clonate. Proprietatea vectorilor derivați din plasmidul ColE1 de a se replica timp de 7—12 ore în prezența cloramfenicolului permite ca într-o celulă gena străină purtată de vector să se găsească în cîteva sute de copii, multiplicare impresionantă și utilă creșterii numerice a clonei moleculare. Vectorii derivați din fagul λ își păstrează intacte regiunile de replicare, în schimb își pierd capacitățile de a codifica proteinele și factorii litici proprii strămoșului lor. Prin aceste modificări devin capabili să producă între 50 și 80 de copii pe celulă, valori care rămîn valabile și în condiția integrării de segmente străine.

Scanned with OKEN Scanner

În concluzie, genele străine purtate de vectorii plasmidici se găsesc multiplicate în clone celulare uneori la nivelul ridicat de sute de copii pe celulă. Astfel, integrarea lor în vectori purtători nu le asigură numai clonarea și purificarea din amestecul inițial al organismului donor (procariot sau eucariot), ci și creșterea volumului clonal (fig. 109).

6. **Expresia genică a moleculelor clonate în celulele de E. coli.** Clonarea de gene bacteriene integrate în plasmide vectoare a demonstrat că expresia lor genică poate fi amplificată de multe ori. Prin metode asemănătoare clonării, Müller-Hill (1975) a obținut celule de *E. coli* producătoare de represor lac în cantități de 1000 de ori mai mari decît celulele de tip sălbatic (cap. X). La fel, un vector derivat din bacteriofagul λ care are încorporată gena pentru triptofan-sintetază asigură o producție de enzimă care reprezintă 20% din proteinele solubile ale celulei. În principiu, există posibilitatea ca orice genă străină integrată într-un plasmid vector să poată fi introdusă în celulele de *E. coli*, amplificată, transcrisă și eventual tradusă. Astfel s-au reușit mai multe manipulări genice prin construcția de himere plasmidice între vectori și gene de la eucariote, în care s-au utilizat endonucleazele restrictive decalate și apoi clonarea, amplificarea și expresia lor genică în celule de *E. coli*. Primele gene clonate prin manipulare au fost cele care la organismele donoare se găsesc gata amplificate: genele ribozomale de la *Xenopus laevis* (broasca cu gheare), genele histonice animale și umane. Au urmat apoi genele sintetizate *in vitro* prin reacția de transcriere inversă a moleculelor de ARNm: genele pentru lanțurile hemoglobinice de iepure, genele hemoglobinice umane. Au mai fost clonate segmente de ADN de la ariciul-de-mare, ADN mitocondrial de șoarece, gene izolate de la levuri și *Drosophila melanogaster*, ADN satelit de timus bovin. Mari speranțe, pe cale de realizare practică, sînt îndreptate spre clonarea de segmente de ADN capabile să producă hormoni peptidici (peptidele hipotalamice de tipul somatostatinei, insulina umană, hormoni hipofizari).

Multitudinea de vectori plasmidici, numeroasele endonucleaze restrictive izolate și purificate, deschid posibilitatea planificată de a forma grupări de plasmide recombinant corespunzătoare la diferite organisme (*E.coli*, *Drosophila*, om) iar fiecare grup să cuprindă integrate majoritatea dacă nu toate genele organismului corespunzător (Clarke și Carbon, 1976). Aceste ansambluri de clone genice, denumite „shotgun" sau „bănci genice", deschid perspective analitice mari, mai ales pentru analiza genetică fină la eucariote. În banca genică diferitele gene ale unui organism sînt păstrate fie ca plasmide recombinant sub formă de ADN purificat, fie sub formă de clone izolate în bacterii neconjugabile. O astfel de bancă genică a fost realizată pen-

Scanned with OKEN Scanner

tru genomul de *E.coli* cu ajutorul vectorilor derivați din plasmidul ColE1.

7. **Posibilități de clonare și în alte celule decît *E. coli* și ale integrării de ADN străin în celule eucariote.** Deși avalanșa experiențelor de clonare în celulele de *E. coli* este considerabilă, au început să apară lucrări care indică și *Bacilllus subtilis* ca o gazdă aptă clonărilor (Ehrlich, 1977, 1978), fapt care prezintă avantaje deosebite datorită absenței de potențial patogen la această bacterie și a incapacității sale de transfer genetic prin conjugare.

Oricum, cunoașterea posibilităților de transformare cu ADN segmentar neorganizat repliconic, cu mult înaintea clonării genice, a inspirat cercetări vaste asupra posibilităților manifestate de celulele eucariote de a capta ADN heterolog și eventual de a-l integra în cromozomi. Încă din 1960, Gartler a comunicat posibilitatea ca ADN heterolog străin să fie captat de celulele de mamifer cultivate *in vitro*. În cursul a 10 ani s-au strîns numeroase constatări experimentale prin care se demonstra că ADN segmentar, neorganizat în repliconi, este captat de celule eucariote diverse *in vitro* și *in vivo*, iar uneori este chiar integrat în cromozomi (Ledoux, 1965, 1971).

O altă serie de publicații rezumate de Friedmann și Roblin (1972) și de Merril și colab. (1974) argumentează pentru rolul de purtători pe care-l pot îndeplini virusurile animale și bacteriene în transferul de gene între celule eucariote. Merril comunică, într-un număr de publicații, transducția cu ajutorul fagului λ a regiunii genetice gal$^+$ (codificatoare de enzime ale metabolizării galactozei), de la *E.coli* la celule umane galactozemice cultivate *in vitro*. Se menționează că genele bacteriene reușesc să codifice galactozil-transferază în celulele umane deficitare. Acestea mențin caracterul transdus în succesiunea de generații.

Utilizînd celule cultivate *in vitro* de *Muntiacus muntjak* (un cerb din India) și studiind cromozomii prin tehnici de bandare (cap. XII), Petricciani și Patterson (1974) susțin că polimerul sintetic bicatenar poli(dA) (dT) este captat intracelular și integrat în cromozomi într-o cantitate atît de mare încît produce modificări morfologice vizibile microscopic, ca benzi supranumerare. Deși captările de segmente neorganizate de ADN în celulele de eucariote au o bază experimentală vastă, ca și transferul de segmente neintegrate prin intermediul virusurilor, totuși modelele experimentale sînt disparate și nu au repetabilitatea, logica și gradul de precizie întîlnite la clonările genice prin vectori plasmidici. Dealtminteri, lucrările de sinteză asupra manipulărilor de gene (Cohen, 1975; Murray, 1976; Collins, 1977) nu citează nici unul dintre rezultatele experimentale referitoare la captări de ADN la eucariote, deși ideile, metodologia și scopul fac parte din același ansamblu tematic.

Scanned with OKEN Scanner

8. **Riscurile, avantajele și perspectivele manipulării genelor.** Primele reușite ale obținerii de molecule recombinant *in vitro* și ale clonării de gene în celulele de *E. coli* (Jackson și colab., 1972; Cohen și colab., 1973) au fost urmate la intervale scurte de confirmări ale tehnicilor inițiale. Posibilitatea plurivalentă a recombinării de gene heteroloage, de multiplicare genică selectivă și de expresie genică amplificată cu mijloace economicoase, deschid perspective largi. Dar, ca și în cazul altor descoperiri deschizătoare de epocă, în jurul clonării genelor s-au ridicat probleme ample asupra riscurilor pe care le incumbă folosirea și dezvoltarea necontrolată a tehnicilor de manipulare genică.

1. *Riscurile manipulării de gene și biohazardul potențial; mijloace de prevenire.* Construcția de clone moleculare recombinant în celule de *E.coli*, germen potențial patogen cu capacități de răspîndire a factorilor plasmidici prin conjugări eterospecifice, cît și imposibilitatea de a prevedea exact modul de comportare a organismelor himere au dus la formularea a numeroase riscuri potențiale furnizate de gradul înalt al hazardului care însoțește experiențele efectuate fără control regulamentar. Principalele riscuri sînt următoarele: 1) diseminarea voluntară de bacterii himerice în scopuri aplicative a căror evoluție în natură nu este cunoscută încă; 2) diseminarea accidentală a noilor clone bacteriene din laboratoarele unde au fost create, prin neglijență în mînuirea culturilor, prin sterilizări insuficiente; 3) formarea de clone recombinant cu combinații nemaiîntîlnite de rezistență la antibiotice, producția de bacterii cu virulență și toxicitate necunoscute capabile să producă mari epidemii și entități clinice nemaiîntîlnite; 4) posibilitatea clonării de ADN al virusurilor latente oncogene și redeșteptarea patogenității lor prin clonare sau amplificarea potențialului patogen; schimbarea prin clonare a spectrului de patogenitate a virusurilor oncogene; 5) posibilitatea ca formarea clonelor recombinant să doteze bacteriile clonate cu noi capacități de transfer genetic imprevizibil și prin răspîndirea lor în natură, intenționată sau accidentală, să producă dezechilibre în biosferă cu prejudicii irecuperante și de gravitate deosebită; 6) construirea de clone himerice monstruoase de mare agresivitate patogenă, în scopuri criminale, beligerante. Aceste riscuri potențiale au dus la discuții ample care s-au soldat cu formarea unui comitet internațional condus de americanul Berg (1974) și după un schimb organizat de opinii s-a formulat o scrisoare de interdicție a experiențelor de manipulare genică pînă la elaborarea unui regulament metodologic de desfășurare a experiențelor de clonare. Acest regulament a fost elaborat în S.U.A. (Curtiss III, 1976) și este folosit ca ghid de grupele de cercetători preocupați de clonări genice. Mijloacele de prevenire a riscurilor privind metodologia clonării genice sînt numeroase și se clasifică în două categorii: 1) aplicarea celor mai riguroase reguli de asepsie și

Scanned with OKEN Scanner

de izolare a laboratoarelor și personalului implicat în astfel de cercetări, reguli severe asemănătoare celor utilizate în laboratoarele de fizică nucleară, laboratoarele de toxicologie și laboratoarele de lucru cu germeni patogeni; 2) limitarea biologică a riscurilor prin alegerea judicioasă a celulelor gazdă pentru clonări.

Pentru ultima categorie, Curtiss III (1976) comunică obținerea unei tulpini de *E. coli*, după 13 manipulări genice, caracterizată printr-o serie de caractere restrictive care o fac inaptă să se multiplice în condiții naturale, să transfere material genetic la alte bacterii și care poate crește numai pe un mediu special cu factori de creștere neîntîlniți în natură. În aceeași ordine de idei, pentru că *E. coli* este ancorată în patologia bacteriilor enterice atît prin înrudirile genetice cu bacterii enterice cert patogene *(Shigella, Salmonella)*, cît și prin propriul potențial patogen, s-a propus ca gazdă de clonare *Bacillus subtilis* (Ehrlich, 1977, 1978), bacterie practic nepatogenă și incapabilă de transfer genetic eterospecific natural.

2. *Avantajele și perspectivele manipulării genelor.* Depășirea barierelor de recombinare între specii neînrudite prin manipulare genică a declanșat capacitățile de concepție și imaginative ale cercetătorilor în cadrul nivelului contemporan al cunoștințelor de genetică și de biochimie, de potențiale ecologice și etologice ale organismelor. Dezvoltarea metodelor de clonare genică are profunde implicații științifice și social-economice de mare aplicativitate, din care o parte pot fi prevăzute iar altele rămîn numai considerații teoretive de domeniul speculațiilor. În raport cu organismele folosite drept gazde pentru recombinări himerice și cu gradul de dificultăți tehnice și bioetice, manipulările genice pot fi împărțite în trei etape: clonări genice la bacterii și virusuri; recombinări himerice la nivelul organismelor eucariote; corectări genetice ale bolilor ereditare umane prin terapie genică. Prima este de actualitate, cea de-a doua este de perspectivă, iar a treia rămîne în prezent numai de domeniul speculațiilor teoretice, profund umanitare, dar dificil de conceput cu baza de cunoaștere la care s-a ajuns. Potrivit acestor aserțiuni, se descriu cîteva din avantajele oferite de clonarea genică la bacterii, de actualitate și de perspectivă. Avantajele clonării genelor în gazde bacteriene pot fi divizate didactic în două categorii: 1) avantaje de analiză genetică fină la nivel genic a structurilor și funcțiilor genomice ale organismelor eucariote; 2) avantaje economico-sociale cu aplicativitate imediată.

a) *Avantajele analizelor genetice prin clonare genică la bacterii.* Posibilitățile vaste de recombinare oferite de multitudinea de vectori plasmidici și de numărul mare de endonucleaze restrictive permit construirea de organisme himerice în care să se realizeze studiul a numeroase domenii puțin cunoscute ale organismelor superioare. Imbogățirea unei gene structurale de eucariot în mai multe copii per-

Scanned with OKEN Scanner

mite secvențierea nucleotidică și cunoașterea ei directă. Clonarea de segmente de ADN poate să stabilească structura cromozomilor la eucariote și posibilitatea analizei genetice fine de segmente subgenice, așa cum s-a reușit numai la virusuri și bacterii (cap. XII). Analizele genetice la bacterii himerice pot duce la lămurirea mecanismelor de fuziune a genelor imunoglobulinice în diferențierea idiotipurilor. Expresia genică în clonele bacteriene a segmentelor de ADN eucariotic poate furniza date noi referitoare la mecanismele mai puțin cunoscute de reglare genetică la eucariote și mai ales de activare-inactivare genică în diferențiere și în oncogeneză. Implicațiile analizelor genetice posibile în clonele bacteriene sînt atît de numeroase, încît cuprind majoritatea, dacă nu toate problemele moleculare ale biologiei, de la aspectele taxonomice și de sistematică pînă la analiza stărilor patologice complexe din bolile umane. O metodă de mare perspectivă se arată a fi constituirea de „bănci genice", deși este greu de imaginat tehnic și bioetic formarea unui ansamblu de grupe de clone bacteriene care să cuprindă, de exemplu, majoritatea sau toate genele genomului uman. Oricum, așa cum subliniază Curtiss (1976), aplicativitatea noilor cunoștințe dobîndite prin clonări va avea efecte profunde asupra vieții și va deschide direcții de cunoaștere care în prezent nu pot fi bănuite.

b) *Avantajele economico-sociale ale manipulărilor de gene la bacterii*. Manipulările de gene prin clonări la bacterii oferă avantaje social-economice cu un aspect protean. Aparent, toate domeniile economice și de sănătate publică pot deveni beneficiare ale clonării genice. Pentru exemplificare, să considerăm cîteva posibilități în domeniile agriculturii, sănătății publice și industriei chimico-farmaceutice. În domeniul agro-zootehnic: obținerea de clone bacteriene care să distrugă insectele, paraziții fungici ai plantelor și alți dăunători, bacterii himerice erbicide; producerea de bacterii himerice care prin amplificarea de compuși nutritivi să crească valoarea energetică a nutrețului; amplificarea producerii de substanțe nutritive necesare alimentației publice prin clonarea de gene codificatoare de proteine complete (lactalbumină, cazeină, proteine din carne); himere bacteriene capabile să crească valoarea îngrășămintelor agricole și a utilizării acestora de către vegetalele cerealiere și legumicole. În sănătatea publică: construirea de clone bacteriene recombinant pentru producerea de vaccinuri antivirale, antibacteriene, antimicotice și antiparazitare; clonarea de bacterii pentru combaterea poluării mediului ambiant; bacterii de degradare a deșeurilor menajere și industiale, bacterii consumatoare de petrol și de deșeuri petroliere. În industria chimico-farmaceutică legată direct de asistența sanitară, producerea de clone cu molecule himerice are numeroase posibilități: construirea de tulpini producătoare în cantități optimale de antibiotice, mai ales că sinteza de antibiotice la o parte din tulpinile actuale de fungi pare

Scanned with OKEN Scanner

să fie codificată de gene plasmidice; producția de hormoni peptidici pe scară industrială prin clonare de gene umane și amplificarea lor în bacterii gazdă (producția de somatostatină, producția de insulină); utilizarea clonelor bacteriene pentru producerea de enzime homospecifice umane pentru suplimentarea deficitelor metabolice, procedeu care ar elimina inconvenientul reacțiilor imunologice induse de enzimele eterospecifice; construirea de clone bacteriene himerice pentru sinteza necostisitoare de proteine dietetice necesare în alimentația bolnavilor cu deficiențe în metabolizarea de aminoacizi: proteine fără fenilalanină pentru fenilcetonurici, proteine fără aminoacizi cu catenă ramificată pentru bolnavii deficitari în α-cetoacid-decarboxilaze (cap. XI).

Lista posibilităților aplicative ale metodelor de manipulare genică la bacterii poate fi foarte voluminoasă; iar în cele de mai sus au fost considerate cîteva exemple stimulatoare din care o parte sînt pe cale de a fi realizate. Din aceste cîteva exemple reiese că în multe procedee pentru utilizarea clonelor himerice, beneficiarii trebuie să le răspîndească în mediul ambiant, motiv pentru care au fost impuse o seamă de restricții temporare pînă la o verificare riguroasă a comportamentului clonelor bacteriene utilitare în diferite ecosisteme. De fapt, o mare parte din bacteriile himerice sînt viețuitoare practic neîntîlnite în biosferă și asupra lor se impun aceleași suspiciuni și precauții pe care le-au luat echipele cosmonautice cînd au adus materiale extraterestre cu ocazia călătoriilor cosmice (Cohen, 1975).

Utilizarea manipulărilor de gene în recombinări himerice la organisme eucariote economic folositoare și mai ales în terapia genică umană constituie domenii în prezent speculative, cu o bază experimentală precară și hazardată. Aceste domenii sînt ale unui viitor mai apropiat pentru speciile economice și mai îndepărtat pentru om. În terapia genică pe baza recombinărilor moleculare s-au făcut multe considerații speculative și chiar clasificări ipotetice de metodologie, de restricții și posibilități. Astfel de considerații sînt acum forțate și impuse de cea mai liberă manifestare a omului, gîndirea. Totuși nivelul de cunoaștere contemporan deschide perspective de mare optimism în cooperarea pentru acțiunea de clonare genică la bacterii, cu clonarea cromozomică în hibridizările somatice și cu ameliorările speciilor economic importante.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

ABDEL-MONEM, M., DÜRVALD, H., HOFFMANN-BERLING, H., 1976, *Enzymic unwinding of DNA. 2. Chain separation by an ATP-dependent DNA unwinding enzyme*, Eur. J. Biochem., *65*, 441.

AGARVAL, K. L., şi COLAB., 1970, *Total synthesis of the gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast*, Nature, *227*, 27—34.

ALBERTS, B. M., FREY, L., 1970, *The bacteriofage gene 32 : a structural protein in the replication and recombination of DNA*, Nature, *227*, 1313—1318.

ALLISON, A.C., 1972, *Genes and proteins. The Biochemical Genetics of Man*, Editori D.J.H. Brock & O. Mayo., Academic Press, N.Y. & London, 39.

ALTENBERN, R.A., 1971, *Marker frequency analysis mapping of the Staphylococcus aureus chromosome*, Can. J. Microbiol., *17*, 903.

ALTENBERN, R. A., 1973, *Chromosomal mapping of Brucella abortus strain 19*, Can. J. Microbiol., *19*, 109.

AMALRIC, F.S., BERNARD, S., SIMARD, R., 1973, *Detection of single-stranded DNA in the nucleolus*, Nature New Biol., *243*, 38.

AMES, B,N., HARTMAN, P.E., 1963, *The histidin operon*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., *28*, 349.

ANRAKU, N., TOMIZAWA, J., 1965, *Molecular mechanisms of genetic recombination of bacteriophage. V. Two kinds of joining of parental DNA molecules*, J. Mol. Biol., *12*, 805.

ANTOHI, S., MORARU, I., 1970, *Possible isozyme structures in malate dehydrogenase from Bacillus subtilis*, Biochem. Biophis. Res. Comm., N. Y., *39*, 226.

ANTOHI, S., POPESCU, AL., 1979, *Lethal effect of protamine and histone on competent Bacillus subtilis cells. Inhibition of genetic transformation by protamine in sublethal concentration*, Molec. gen. Genet., *172*, 345—349.

ARBER, W., LINN, S., 1969, *DNA modification and restriction*, Ann. Rev. Biochem., *38*, 467.

ARRIGHI, FR., HSU, T.C., 1971, *Localization of heterochromatin in human chromosomes*, Cytogenetics, *10*, 81—86.

ATTARDI, G., 1967, *Mechanism of protein synthesis*, Ann. Rev. Microbiol., *21*, 383.

ATTARDI, G., AMALDI, F., 1970, *Structure and synthesis of ribosomal RNA*, Ann. Rev. Biochem., *39*, 183—226.

Scanned with OKEN Scanner

DAWID, I.B., 1972, *Mitochondrial protein synthesis.* (in:) *Mitochondria, Biogenesis and Bioenergetics*, ed. S. G. Vanden Bergh et al., Elsevier, North Holland, Amsterdam, 35—51.

DAWID, I.B., KLUKAS, C.K., OHI S., RAMIREZ, J.L. & UPHOLT, W.B., 1976, *Structure and evolution of animal mitochondrial DNA* (in:), Saccone & Kroon (1976), 3—14.

DAWSON, D.M., GOODFRIEND, T.L., KAPLAN, N.O., 1964, *Lactic dehydrogenases and their functions*, Science, 143, 929.

DEFER, N., DASTUGUE, B., KRUH, J., 1974, *Direct binding of corticosterone and oestradiol to rat liver nuclear nonhistone proteins*, Biochimie, 56, 559.

DELANGE, R.J., FAMBROUCH, D.M., SMITH, E.L., BONNER, J., 1969, *Calf and pea histone IV. Complete aminoacid sequence of pea seedling histone IV. Comparison with the homologous calf thymus histone*, J. Biol. Chem., 244, 5669.

DELANGE, R.J., SMITH, E.L., 1974, *Chromosomal proteins*, in *The Proteins*, Neurath H. Hill R.L. ed., vol. 4, Academic Press, New York.

DELANGE, R.J., SMITH, E.L., 1971, *Histones structure and function*, A. Rev. Biochim., 40, 279.

DELLA LATTA, P. BOUANCHAUD, P., NOVICK, R.P., 1978, *Partition kinetics and thermosensitive replication of pT169, a naturally occuring multicopy tetracycline plasmid of S. aureus* — Plasmid, 1, 366.

DE LUCIA, P., CAIRNS, J., 1969, *Isolation of an E.coli strain with a mutation affecting DNA polymerase*, Nature, 224, 1164.

DELBRÜCK, M., STENT, G.S., 1957, *On the mechanism of DNA replication.* In: *„The Chemical Basis of Heredity"*, W.D. Mcelroy B.Glass (ed.), Baltimore, Johns Hopkins Press, p. 699.

DE MAN, J.C., NOORDUYN, N.J.A., 1969, *Ribosomes: properties and function.* (In:) A. LIMA-DE-FARIA (Ed.) *„Handbook of molecular Cytology"*, North. Holland Publ. Comp., Amsterdam-London, p. 1079.

DEMEREC, M., 1931, *Somatic mutation of color gene in Delphinium*, J. Genet., 24. 178.

DE VRIES, J.K., MAAS, W.K., 1971, *Chromosomal integration of factors in recombination-deficient Hfr strains of E.coli*, J. Bacteriol, 106, 150.

DEWAIR, M.A., MATTHAEI, H., 1976, *Tissue specificity of nonhistone protein from human chromatine*, Mol. gen. Gen., 146, 309—312.

DHINGRA, M.M., SARMA, R.H., 1978, *Why do nucleic acids have 3′—5′ phosphodiester bonds?* Nature, 272, 798.

DICKERSON, R.E., 1972, *X-ray studies of protein mechanism*, Ann. Rev. Biochem., 41, 815.

DILTS, J.A., 1976, *Covalently closed circular DNA in kappa endosymbionts of Paramecium*, Genet. Res., 27, 161.

DOBZHANSKY, T., 1951, *Genetics and the Origin of species*, 3rd ed., Columbia University Press, New York.

DOOLITTLE, W. F., PACE, N.R., 1971, *Transcriptional organization of the ribosomal RNA cistrons in Escherichia coli*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 68, 1786.

Scanned with OKEN Scanner

GILHAM, P.T., 1970, *RNA sequence analysis*, Ann. Rev. Biochem., 39, 227.

GILLHAM, N.W., BOYTON, J.E., HARRIS, E.H., SHEPHERD, H.S., FOX, S.B., GRABOWY, C.T., 1978, *Chloroplast genes in Chlamydomonas : mapping and function*, Plenary Sess. Symp. (Abstr.), XIV, Int. Congr. Genetics, Moscow, 55—56.

GILLAM, S., ROTTMAN, F., JAHNKE, P., SMITH, M., 1977, *Enzymatic synthesis of oligonucleotides of defined sequence : synthesis of a segment of yeast iso-1-cytochrome c gene*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 74, 96.

GOLDBERG, A.L., DICE, J.F., 1974, *Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells*, Ann. Rev. Biochem, 43, 835.

GOLDRING, E. S., GROSSMAN, L. J., KRUPNICK, D., CRYER, D.R., MARMUR, J., 1970, *The petite mutation in yeast : loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide*, J. Mol. Biol., 52, 323.

GOULIAN, M. & KORNBERG, A., 1967, *„Enzymatic synthesis of DNA XXIII. Synthesis of circular replicative form of phage Φ X 174 DNA*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 58, 1723.

GOLDSCHNEIDER, I., GREGOIRE, C.E., BARTON, R.W., BOLLUM. F.J., 1977, *Demonstration of terminal deoxynucleotidyl transferase in thymocytes by immunofluorescence*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 74, 734.

GOLDSTEIN, A., KIRSCHBAUM, J.B., ROMAN, A., 1965, *Direction of synthesis of messenger RNA in cells of Escherichia coli*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 54, 1669.

GOODENOUGH, U., LEVINE, R.P., *Genetics*, 1974, Editura Holt, Rinehart and Winston Inc., New York.

GOSS, S.J., HARRIS, H., 1975, *New method for mapping genes in human chromosomes*, Nature, 255, 680.

GOULIAN, M., KORNBERG, A., SINSHEIMER, R.L., 1967, *Enzymatic Synthesis of DNA. XXIV. Synthesis of Infections Phage Φ × 174 DNA*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 58, 2321.

GRANICK, S., GIBOR, A., 1967, *The DNA of chloroplasts, mitochondria and centrioles*, Progr. Nucl. Acid. Res., 6, 143.

GRELL, R.F., 1978, *High frequency recombination in centromeric and histone regions of Drosophila genomes*, Nature, 272, 78—79.

GRILLO, M.A., 1970, *Cytoplasmic inclusions resembling nucleoli in sympathetic neurons of adult rats*, J. Cell Biol., 45, 100.

GRINDLEY, N.D.F., HUMPHREYS, G.O., ANDERSON, E.S., 1973, *Molecular studies of R factor compatibility groups*, J. Bacteriol., 115, 387.

GRINDLEY, N.D.F., KELLEY, W.S., 1976, *Effects of different alleles of the E.coli K12 polA gene on the replication of nontransferring plasmids*, Molec. gen. Genet., 143, 311.

GROS, F., HIATT, H., GILBERT, W., KURLAND, C.G., RISEBROUGH, R.W., WATSON, J.D., 1961, *Unstable ribonucleic acid revealed by pulse labeling of Escherichia coli*, Nature, 190, 581.

GROSSMAN, L., GOLDRING, E.S., MARMUR, J., 1969, *Preferential syntheses of yeast mitochondrial DNA in the absence of protein synthesis*, J. Mol. Biol., 46, 367.

GRUNBERG-MANAGO, M., 1959, *Phosphorolyse et configuration macromoleculaire des polyribonucleotides de biosynthèse et des acides ribonucleiques*, J. Mol. Biol., 1, 240

Scanned with OKEN Scanner

TROCHERIS, I., 1978, *La forme du chromosome : une question de proteines*, La Recherche, *9*, *88*, 376.

TZAGOLOFF, A., AKAI A., NEEDLEMAN, R.B. & ZULCH, G., 1975, *Assembly of the mitochondrial membrane system. Cytoplasmic mutants of Saccharomyces cerevisiae with lesions in enzymes of the respiratory chain and in the mitochondrial ATP-ase*, J. Biol. Chem., 250, 8236—8242.

UHLIN, B.E., şi NORDSTRÖM, K., 1975, *Plasmid incompatibility and control of replication : copy mutants of the R factor R1 in E.coli, K 12*, J. Bacteriol., *124*, 641.

UMANSKII, S.R., 1976, *Neghistonovîe belki hromatina. Vîdelenie, svoiostva, funcţii roli v reguleaţii transcripţii*, Uspehi biologhiceskoi himii, XVII, Izd. Nauka, Moskva, 26.

UMBARGER, H.E., 1956, *Evidence for negative feedback mechanism in the biosynthesis of isoleucine*, Science, *123*, 848.

UMBARGER, H.E., 1964, *Intracellular regulatory mechanisms*, Science, *145*, 674.

UNWIN, P.N.T., 1977, *Three dimensional model of membrane bound ribosomes obtained by electron microscopy*, Nature, *269*, 118.

VENKSTERN, T.V., 1976, *Biosintez transportnîh ribonucleinovîh kislot*, Uspehi biologhiceskoi himii, t.XVII, 3, Izd. Nauka, Moskva.

VOGEL, F., RATHENBERG, R., 1975, *Spontaneous mutation in Man*, in Advances in Human Genetics, p. 223, H. Harris & K. Hirschhorn. Plenum Press, N.Y.

WAHBA, A., M. MILLER, A. NIVELEAU, T. LANDERS, G. CARMICHAEL, K. WEBER, D. HOWLEY, L. SLOBIN, 1974, *Subunit I of Q β replicase and 30 S ribosomal protein S_1 of E.coli. Evidence for identity of the two proteins*, J. Biol. Chem. 249, 3314.

WALKER, J.M., GOODWIN, G.H., JOHNS, E.W., 1976, *The similarity between the primary structure of two non-histone chromosomal proteins*, Eur J. Biochem., *62*, 461.

WARBURTON, F.E., 1955, *Feedback in development and its evolutionary significance*, American Naturalist, *89*, 129.

WARNER, H.R., DUNCAN, B.K., 1978, *In vivo synthesis and properties of uracil containing DNA*, Nature, *272*, 5648, 32.

WATSON, J.D., 1963, *Involvement of RNA in the synthesis of proteins*, Science, *140*, 17.

WATSON, J.D., 1974, *Biologia moleculară a genei*, traducere de A. Aubert- Combiescu, Editura ştiinţifică, Bucureşti.

WATSON, J.D., CRICK, F.H.C., 1953a, *A structure for deoxyribonucleic acid*, Nature, *171*, 737.

WATSON J.D., & CRICK F.H.C., 1953 b, *Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid*, Nature, *171*, 864.

WATTS, R.W., 1974, *Molecular variation in relation to purine metabolism*, J. Clin. Path., 27., suppl. 8, p. 48.

WEINBERG, R.A., PENMAN, S., 1970, *Processing of 45 S nucleolar RNA*, J. Mol. Biol., *47*, 169.

WEINBERG, R.A., 1973, *Nuclear RNA metabolism*, Ann. Rev. Biochemistry, *42*, 329.

WEISSBACH, A., BALTIMORE, D., BOLLUM, F., GALLO, R., KORN, D., 1975, *Nomenclature of eukaryotic DNA polymerases*, Eur. J. Biochem., *59*, 1.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 7

Caracteristicile genomului la cîteva virusuri reprezentative
(după Kleinschmidt, 1969)

Tipul de virus	Denumirea	Gazda	Greut. molec. a virionului (X 10^6)	Greut. molec. a acidului nucleic (X 10^6)	Lungimea cromozomului viral (în μm)	Procent GC în cromozom (%)	Descrierea cromozomului (forma)
Fagi cu ADN dublu-catenar	T_2, T_4, T_6	*E.coli*	220	11	56	35	baghetă, permutări circulare
	T_7	*E.coli*	38	24	12	48	baghetă, secv. mică
		E.coli	66	30	17	49	baghetă cu capete adezive
	80	*E.coli*	—	29	14	53	baghetă cu capete adezive
	P_2	*E.coli*	—	20	10	—	baghetă cu capete adezive
	P_{22}	*Salmonella*	—	26	14	48	
	SP_{29}	*B.subtilis*	—	11	5,8	—	
Fagi cu ADN monocatenar	φX174	*E.coli*	6,2	1,6	1,8	A : 25, T : 33 G : 24, C : 18	Circulară
	fd	*E.coli*	11,0	1,7	—	A : 24, T : 34 G : 20, C : 22	Circulară
Virusuri animale cu ADN dublu-catenar	Herpes	om	—	100	53	68	
	Pox	om	3200	160	89	37	
	Polioma	șoarece	25	2,9—3,4	—	48	circulară, superspiralizată
	SV40	om	17	2,3—2,5	—	41	circulară, superspiralizată
Fagi cu ARN monocatenar	Qβ	*E.coli*	4,2	1,5	14	A : 22, U : 29 G : 24, C : 25	
	R	*E.coli*	3,6	1,1	1,1	A : 25, U : 25 G : 27, C : 25	

Scanned with OKEN Scanner

Virusuri animale mici cu ARN-monocatenar	Poliomielita	om	5,5	2	—	A : 28, U : 25 G : 25, C : 22	
	Virusul bolii picioarelor şi a gurii	vacă	6	3,1	—	A : 26, U : 22 G : 24, C : 28	
	Coxsackie A	om	7	2	—	A : 27, U : 25 G : 28, C : 20	
Virusuri mari cu ARN monocatenar la animale şi plante	Virusul mozaicului tutunului (VMT)	tutun	50	2,1	—	A : 30, U : 26 G : 25, C : 19	
	Influenza	om	300	2,9	—	A : 23, U : 23 G : 20, C : 24	numeroase segmente
	Boala Newcastle	păsări	800	7,5	—	A : 26, U : 22 G : 25, G : 27	
	Leucemia murină	şoarece	220	13	—	A : 25, U : 23 G : 25, C : 27	numeroase segmente
Virusuri cu ARN dublu-catenar	Reovirus	mamifere	70	17	8,3	A : 38, U : 28 G : 17, C : 17	numeroase segmente
	Wound tumor	plante	—	10	—	A : 31, U : 32 G : 19, C : 19	numeroase segmente

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 8

Cantitatea de ADN pe genom şi pe cromozom
(după Ris şi Kubai, 1970)

Organisme	ADN (în pg)	Lungimea (în μm)
Virusuri		
φX174	$2{,}6 \times 10^{-6}$	2
	50×10^{-6}	17
T_2	208×10^{-6}	55
Fowpox	382×10^{-6}	91
Bacterii		
Mycoplasma	840×10^{-6}	265
E.coli	$4\,000 \times 10^{-6}$	1200
Ciuperci		
Drojdii	$22\,000 \times 10^{-6}$	
Protozoare		
Astasia longa	1,5	
Plante		
Aquilegia sp.	0,6	
Gladiolus sp.	3	
Lilium longiflorum	53	
Tradescantia	58	
Mamifere		
Om	3,2	

Tabelul 10

Nomenclatura histonelor propusă de Simpozionul CIBA Foundation, *1974*
(Bradbury, 1975)

Principalele fracţiuni histonice	Simbolul fracţiunii	Raportul lizina/ arginină	Nomenclatura	Greutatea moleculară (în daltoni)
Histoane bogate în lizină:				
a) foarte bogate în lizină				
b) bogate în alanină	F_1	20	1 (H_1)	20 000
Histone cu conţinut mediu de lizină:				
a) bogate în leucină	F_2a_2	1,0—1,2	2A (H_2A)	15 000
b) bogate în serină	F_2b_2	2,5	2B (H_2B)	13 774
Histone bogate în arginină				
a) bogate în acid glutamic	F_3	0,72	3 (H_3)	15 324
b) bogate în glicină	F_2a_1	0,79	4 (H_4)	11 282
Alte histone				
Histone unice bogate în lizină din eritrocite nucleate	F_2cd		5 (H_5)	
Histone bogate în lizină de la păstrăvul curcubeu			6 (H_6)	

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 9

Clasele de secvență din ADN-ul cîtorva animale
(Britten și colab., 1973)

Organismul și clasele de secvență	Frecvența de repetiție	Canti-tatea	Complexi-tatea
Nassaria obsoleta			
nerepetată	1	38%	$1{,}1 \times 10^9$
ușor repetată	20	12%	$4{,}7 \times 10^7$
intermediar repetată	1000	15%	$4{,}5 \times 10^5$
înalt repetată	peste 1000 pînă	18%	
(legarea la timp zero*)	la sute de mii		
Bos taurus (viței)			
nerepetată	1	55%	$1{,}5 \times 10^9$
intermediar repetată	60 000	38%	$1{,}7 \times 10^4$
înalt repetată	1 000 000	2%	60
foarte înalt repetată		3%	
(legarea la timp zero)			
Xenopus laevis			
nerepetată	1	54%	$1{,}6 \times 10^9$
ușor repetată	20	6%	$1{,}5 \times 10^7$
intermediar repetată	1 600	31%	$6{,}0 \times 10^5$
înalt repetată	32 000	6%	$6{,}0 \times 10^3$
foarte înalt repetată și legarea la timp zero		3%	
Strongylocentrotus purpuratus			
nerepetată	1	38%	$3{,}0 \times 10^8$
ușor repetată	20—50	25%	10^7
intermediar repetată	250	27%	10^6
înalt repetată	6 000	7%	$1{,}3 \times 10^4$
foarte înalt repetată și legarea la timp zero		3%	

* legarea la timpul zero implică prezența fracțiunilor de secvență palindromică pe baza cărora apar împerecheri instantanee intracatenare.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 11

Conținutul de ADN extranuclear (în perechi nucleotide)

(după Sparrow și colab., 1972)

Organismul	Cloroplaste	Mitocondrii
Bos taurus (inimă)		$5{,}2 \times 10^4$
Gallus domestica (ficat)		$1{,}4 \times 10^5$
Celule L (fibroblaste de șoarece)		$1{,}8 \times 10^5$
Phaseolus sp.		$1{,}0 \times 10^5$
Brassica sp. (nap)		$1{,}0 \times 10^6$
Paramecium aurelia		$7{,}4 \times 10^5$
Tetrahymena piriformis		$7{,}4 \times 10^5$
Arici-de-mare		$4{,}6 \times 10^5$
Șobolan (ficat)		$1{,}8-3{,}2 \times 10^5$
Drojdie		$1{,}2-7{,}4 \times 10^5$
Acetabularia mediterranea	$1{,}8 \times 10^5$	
Chlamydomonas reinhardi	$2{,}0 \times 10^7$	
Euglena gracilis	$2{,}0 \times 10^7$	
Antirrhinum majus	$1{,}1 \times 10^7$	
Brassica sp.	$1{,}0 \times 10^6$	
Ipomaea sp.	$1{,}0 \times 10^6$	
Phaseolus vulgaris	$2{,}8 \times 10^7$	

Scanned with OKEN Scanner

Redactor: LAURA MĂRGINEANU
Tehnoredactor: CONSTANTIN IORDACHE

Coli de tipar: 30,25.
Bun de tipar: 03.03.1981.

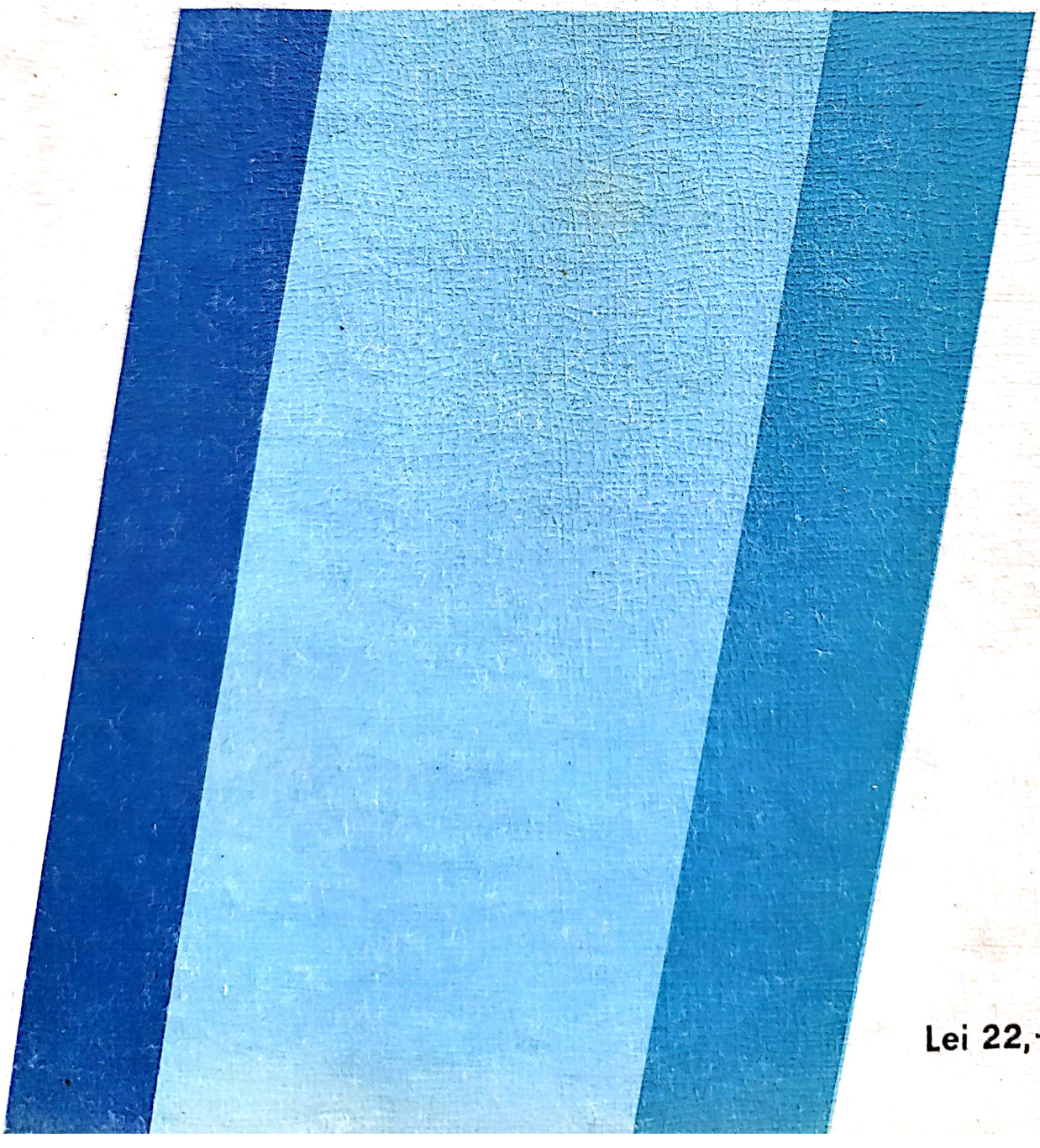
Întreprinderea Poligrafică Cluj,
Municipiul Cluj-Napoca, B-dul Lenin nr. 146.
Republica Socialistă România
Comanda nr. 288

Scanned with OKEN Scanner

Editura științifică și enciclopedică

Cartea **Progrese în genetica moleculară** este o sinteză a datelor moderne privind nivelul molecular al eredității, variabilității și expresiei fenotipice.

Lucrarea punctează momentele esențiale ale fundamentării geneticii moleculare, evidențiind elementele de progres. Principalele mecanisme legate de replicarea și transcrierea ADN, decodificarea mesajului genetic, recombinarea și mutageneza, tranzițiile alosterice, reglarea activității genice interesînd diferite trepte ale transferului informațional — iată cîteva probleme abordate de autori și explicate în lumina concepțiilor actuale în genetica moleculară.



Lei 22,—

Scanned with OKEN Scanner